

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Epidemiología molecular de las poblaciones bacterianas de
Mannheimia haemolytica y *pasteurella multocida* asociadas a la
presencia de lesiones neumónicas en corderos en matadero**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Chris Evelyn Pinto Jiménez

Directoras

M^a Dolores Cid Vázquez

M^a del Carmen Martín Espada

Madrid, 2016



FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

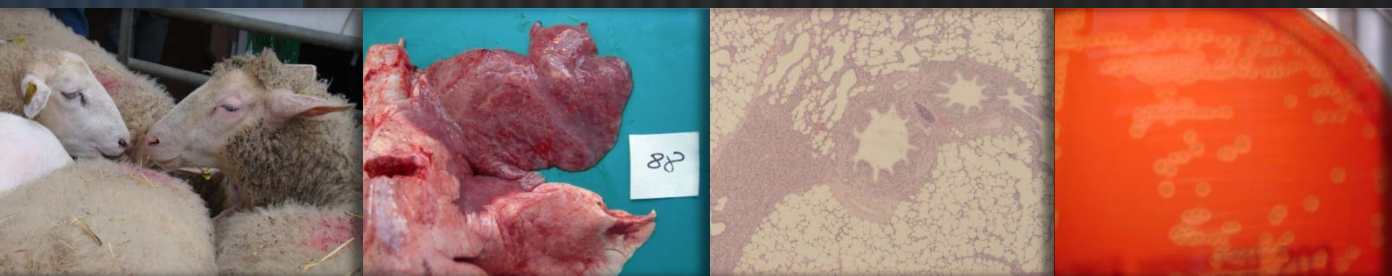
U
C
M

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS POBLACIONES
BACTERIANAS DE *Mannheimia haemolytica* Y
Pasteurella multocida ASOCIADAS A LA PRESENCIA DE
LESIONES NEUMÓNICAS EN CORDEROS EN
MATADERO

TESIS DOCTORAL

Chris E. Pinto Jiménez

2011





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

TESIS DOCTORAL

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS POBLACIONES
BACTERIANAS DE *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*
ASOCIADAS A LA PRESENCIA DE LESIONES NEUMÓNICAS EN
CORDEROS EN MATADERO**

CHRIS EVELYN PINTO JIMÉNEZ
MADRID, 2011

Memoria presentada para obtener el grado académico de Doctora por la Universidad
Complutense de Madrid

DIRECTORA DE TESIS:

PROF. DRA. M^A DOLORES CID VÁZQUEZ (UCM)

CO-DIRECTORA DE TESIS:

PROF. DRA. M^A DEL CARMEN MARTIN ESPADA (UCM)

Dña. **María Dolores Cid Vázquez**, Profesora Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y

Dña. **María del Carmen Martin Espada**, Profesora Asociada a Tiempo Completo del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

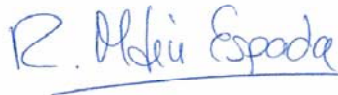
CERTIFICAN:

Que Dña. Chris Evelyn Pinto Jiménez, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS DE *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* ASOCIADAS A LA PRESENCIA DE LESIONES NEUMÓNICAS EN CORDEROS EN MATADERO”**, que reúne los requisitos necesarios para ser presentado como tesis doctoral.

En Madrid, a 26 de abril de 2011



Fdo.: Dra. Mª Dolores Cid Vázquez



Fdo.: Dra. Mª del Carmen Martin Espada

A Díos y mi familia,

Siempre ten presente que la piel se arruga, el pelo se vuelve blanco,
Los días se convierten en años...
Pero lo importante no cambia; tu fuerza y tu convicción no tienen edad.
Tu espíritu es el plumero de cualquier tela de araña.
Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.
Detrás de cada logro, hay otro desafío.
Mientras estés viva, siéntete viva.
Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.
No vivas de fotos amarillas...
Sigue, aunque todos esperen que abandones.
No dejes que se oxide el hierro que hay en ti.
Haz que en vez de lástima, te tengan respeto.
Cuando por los años no puedas correr, trota.
Cuando no puedas trotar, camina.
Cuando no puedas caminar, usa el bastón.
iiiPero nunca te detengas!!!

Madre Teresa de Calcuta

Esta investigación ha sido financiada por el Banco Santander Central Hispano y la Universidad Complutense de Madrid (UCM) proyecto PR34/07-15910, y por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MICINN) proyecto AGL2009-10136.

Chris E. Pinto Jiménez ha realizado el doctorado con el apoyo del Programa Alþan, Programa de Becas de Alto Nivel de la Unión Europea para América Latina, beca nº E07D404011PE.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil para mí expresar con palabras, la profunda gratitud que siento hacia las personas que de una u otra manera me apoyaron tanto académica como anímicamente en la elaboración y realización de esta tesis doctoral. Este ha sido uno de los desafíos más importantes de mi vida, cambiar de país, aprender a vivir sola y conocer gente nueva no ha sido nada fácil. En estos 4 años he crecido como persona, como profesional, he descubierto una nueva cultura y una nueva forma de vivir. Todo ha tenido sus pro y sus contra, ha sido un gran sacrificio mantenerme lejos de mi tierra y los míos por tanto tiempo, el no haber podido asistir al funeral de mi abuela y no haber podido ayudar a mi querida mascota siendo veterinaria, han sido de los momentos más difíciles de esta travesía. Gracias a Dios he encontrado en mi camino siempre gente buena y dispuesta a tenderme una mano. Ahora puedo decir, sin temor a equivocarme, que salir de mi país para realizar el doctorado, ha sido una de las mejores y más importantes decisiones de mi vida.

Agradezco especialmente a mis directoras de tesis Dra. Dolores Cid y Dra. Carmen Martín por el tiempo que le han dedicado a la ejecución y elaboración de esta tesis. Gracias por la confianza depositada, por los buenos recuerdos haciendo el muestreo en la madrugada, por las horas de trabajo en el laboratorio y por las tantas tartas que compartimos gracias a Carmen.

Agradezco por sobre todas las cosas a mis Padres, que tuvieron que soportar mi ausencia durante estos cuatro años. A mi madre que es mi ejemplo de mujer luchadora y sensible, ella es todo amor y bondad, sin ella y su dedicación no hubiera podido ser la persona que hoy soy. A mi padre, persona a la que admiro profundamente, ejemplo de tesón y disciplina, él me inculcó desde pequeña el deseo de aprender y mejorar siempre. Gracias al apoyo de ambos, porque sin ustedes hoy yo no estaría donde estoy soy lo que soy gracias a ustedes! Son sin duda lo mejor de mi vida. ¡Los Amo!

A mi hermana, por su apoyo incondicional desde siempre. Katita, tu siempre fuiste como una madre para mí, nunca terminaré de agradecerte todo lo que haces por mí. Gracias por darme esos sobrinos tan maravillosos. ¡Te quiero hermana!

A Paul Salas, gracias por tu apoyo y por la fuerza que siempre me transmites, gracias por enseñarme a confiar en mí y por haberme dado tantos años de felicidad. Sin tu apoyo estar aquí hubiera sido casi imposible. Sé que tengo en ti un amigo para toda la vida. ¡Gracias Paul!

Al Programa Alþan por haberme dado la oportunidad de estudiar en el extranjero y realizar el doctorado.

Un especial y más sincero agradecimiento al Dr. Ricardo De la Fuente López, catedrático de la UCM, quien me abrió las puertas de su grupo de investigación INBAVET y me dio la oportunidad de realizar la investigación doctoral. ¡Gracias Ricardo por tu ayuda y por confiar en mí sin conocerme!

A todos los veterinarios y veterinarias que desde sus puestos de trabajo en los mataderos contribuyeron significativamente a realizar el muestreo para esta tesis.

A mi alma mater la UNMSM, donde aprendí todo lo necesario para ser un buen veterinario, y donde conocí y forjé las mejores y más duraderas amistades, con las que aprendí a ser mejor persona. Gracias a Jane, Rox, Vane, Sofy, Pao, Fio, Mi, Chio, Dany, Marcos, Miguel, Hugo, Josmel y Renzo. ¡Gracias chicos por las horas gastadas en escribirme correos para darme ánimo o simplemente para ayudarme con algún favor que necesitaba!

A mis profesores de la UNMSM, en especial a la Dra. Sonia Calle, quien además de ser mi profesora, y la jefa del laboratorio donde trabajé, es para mí un ejemplo de mujer y de profesional.

Gracias por hacerme sentir siempre respetada como profesional y como persona. Usted es la mejor. ¡Muchísimas gracias por su confianza!

Al Dr. Felipe San Martín y al Dr. Raúl Rosadio, quienes me apoyaron en el difícil y engorroso camino de solicitar la beca para realizar el doctorado, gracias por su ayuda y por confiar en que podía llevar a cabo este proyecto. ¡Muchas gracias!

A todas las personas en la UCM que apoyaron la realización de este trabajo doctoral, a los integrantes de INBAVET, y a los que me ayudaron resolviendo mis dudas o enseñándome algunos trucos del laboratorio. Gracias por hacerme sentir siempre como un miembro más del grupo. Gracias por eso a Gustavo Domínguez, Antonio Orden, José Ruiz Santa-Quiteria, Susana Martínez, Javi Carrión, y a Nerea García (VISAVET).

A todos mis compañeros becarios, que sufrieron conmigo y conocen en carne propia el difícil proceso de elaboración de una tesis doctoral. Por las muchas horas que pasamos juntos estandarizando PCR's o haciendo miles de geles de agarosa, por sus consejos y por compartir conmigo sus conocimientos. Por los gratos momentos compartidos durante las comidas, tomándonos un café o "terrazeando" por las calles de Madrid. Gracias Pili, Alberto, Almira, Sonia y Mauricio por el tiempo compartido, por los ratos de diversión y por no permitir que me sienta sola. Sé que ahora además de ser mis compañeros también son mis amigos. ¡Mil gracias chicos! He tenido la suerte de encontrarme con personas como ustedes.

A Aldara, tengo que dedicarte a ti un párrafo entero, eres sin duda la persona que más me ha ayudado y apoyado en este proceso. No te imaginas lo agradecida que estoy contigo. Muchísimas gracias por tu apoyo, por tu amistad, por los viajes juntas, por las horas hablando por teléfono, porque cuando me sentía triste tu siempre estabas ahí para apoyarme y si era necesario ibas a verme y hacerme compañía, por tener una madre tan maravillosa como Maribel que me ha tratado siempre con cariño y por tantas cosas que hemos vivido. Te has convertido en una gran amiga para mí y sabes que desde donde esté siempre podrás contar conmigo. Conocerme fue una de las mejores cosas que me pasó estando aquí. ¡Muchas gracias niña!

A mis amigos de toda la vida Carlos y Oscar, gracias por compartir a su familia conmigo, ustedes se convirtieron en mi familia aquí en Madrid y han sido sin duda un gran apoyo para mí. Gracias Sra. Rosa por ser como una madre para mí. Gracias Laylin por haberme abierto las puertas de tu casa.

A todas mis compañeras de piso, con las que compartí momentos inolvidables y con las que pude convivir como en una familia. Gracias a Vane, Mary, Estefa, Karla y Emily, gracias chicas porque además de ser mis compañeras, fueron también como mis hermanas, con las que me divertía y discutía como en casa ija, ja! Gracias a vosotras ahora tengo donde quedarme cada vez que vaya a visitar Brasil, Chile, Ecuador o EEUU. ¡Las echo de menos a todas!

Al personal administrativo de la UCM, en especial a Reyes, Eva y Flora, gracias por regalarme una sonrisa cada mañana y por su amabilidad conmigo.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas, que siempre me han animado a seguir adelante. Espero no haber olvidado a nadie, y si ha sido así, mil disculpas a todos los que no han sido mencionados, seguramente también estoy agradecida con ustedes.

¡MUCHÍSIMAS GRACIAS A TODOS!

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XIII
SUMMARY.....	XVII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. GENERALIDADES	3
I.2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR: CONCEPTOS BÁSICOS Y DEFINICIONES	5
I. 3. ETIOLOGIA DE LA PASTEURELOSIS NEUMONICA OVINA	7
I.4. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE BACTERIAS DE LA FAMILIA PASTEURELLACEAE ASOCIADAS CON PASTEURELOSIS NEUMÓNICA OVINA	8
I.4.1. <i>Pasteurella multocida</i>	9
I.4.2. <i>Mannheimia haemolytica</i>	15
I.4.3. <i>Identificación Molecular de las Pasteurellaceae</i>	19
I.5. FACTORES DE VIRULENCIA EN LAS CEPAS DE <i>MANNHEIMIA</i> Y <i>PASTEURELLA</i> ASOCIADOS A LA PASTEURELOSIS NEUMÓNICA OVINA	19
I.5.1. <i>Mannheimia haemolytica</i>	21
I.5.2. <i>Pasteurella multocida</i>	32
I.6. EPIDEMIOLOGÍA DE LA PASTEURELOSIS NEUMÓNICA.....	35
I.7. PATOGÉNESIS DE LA PASTEURELOSIS NEUMÓNICA.....	39
I.8. LESIONES PULMONARES.....	43
I.9. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO DE LA PASTEURELOSIS OVINA	44
II. HIPÓTESIS.....	47
III. OBJETIVOS.....	51
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
IV.1. MUESTREO	57
IV.1.1. <i>Animales</i>	57
IV.1.2. <i>Mataderos</i>	57
IV.1.3. <i>Criterios de selección de las muestras</i>	57
IV.2. AISLAMIENTO Y ESQUEMA DE SELECCIÓN DE COLONIAS	58
IV.2.1. <i>Procesado de las muestras:</i>	58
IV.2.2. <i>Siembra de las muestras en el medio de cultivo:</i>	58
IV.2.3. <i>Identificación bioquímica de las colonias sospechosas de ser miembros de la familia Pasteurellaceae:</i>	60
IV.3. CEPAS DE REFERENCIA.....	60
IV.4. CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS	62
IV.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.....	62
IV.5.1. <i>Pruebas bioquímicas (DIATABS) para la identificación de aislados de Mannheimia</i>	62
IV.5.2. <i>Pruebas bioquímicas VITEK® para la identificación de aislados de P. multocida</i>	63
IV.6. EXTRACCIÓN DE ADN	64
IV.6.1. <i>Aislados del complejo Mannheimia-Bibersteinia</i>	64
IV.6.2. <i>Aislados de Pasteurella multocida</i>	64

IV.7. PCR DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.....	64
IV.7.1. PCR de Identificación de aislados de <i>Mannheimia-Bibersteinia</i>	64
IV.7.2. PCR de Identificación de aislados de <i>Pasteurella multocida</i>	65
IV.8. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS POR SECUENCIACIÓN DEL ARN RIBOSOMAL 16S	67
IV.9. DETERMINACIÓN DE BIOTIPOS DE <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i>	68
IV.10. DETERMINACIÓN DE SUBESPECIES DE <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i>	70
IV.11. DETERMINACIÓN DEL SEROTIPO CAPSULAR DE AISLADOS DEL COMPLEJO MANNHEIMIA- BIBERSTEINIA POR HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA (HI)	70
IV.11.1. Producción de antisueros.....	70
IV.11.2. Prueba de Hemaglutinación Indirecta	73
IV.12. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE MANNHEIMIA-BIBERSTEINIA POR PCR	77
IV.12.1. Detección del gen <i>lktA</i> que codifica la proteína estructural de la Leucotoxina	77
IV.12.2. Detección de otros factores de virulencia del complejo M-B.	78
IV. 13. DETERMINACIÓN DEL SEROTIPO CAPSULAR DE <i>P. MULTOCIDA</i> POR PCR.....	83
IV.14. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i> POR PCR.	84
IV.15. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	86
IV.15.1. Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de Mannheimia-Bibersteinia.....	86
IV.15.2. Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de <i>P. multocida</i>	87
IV.16. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS.	89
IV. 17. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE CONSOLIDACIÓN PULMONAR	89
IV.18. ANÁLISIS DE LOS DATOS	92
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
V.1. MUESTREO	95
V.2. LESIONES MACROSCÓPICAS DE LOS PULMONES	97
V.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	103
V.4. CRECIMIENTO BACTERIANO	106
V.5. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	110
V.5.1. Identificación Bioquímica (DIATABS®)	110
V.5.2. Identificación Bioquímica por VITEK®	115
V.6. IDENTIFICACIÓN POR PCR.....	116
V.6.1. Identificación por PCR de aislados del complejo Mannheimia-Bibersteinia.	116
V.6.2. Identificación por PCR de <i>P. multocida</i>	117
V.7. IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN DEL 16S ARN RIBOSOMAL.....	120
V.7.1. Identificación por secuenciación del 16S ARNr de aislados del Complejo Mannheimia-Bibersteinia.....	120
V.7.2. Identificación por secuenciación del 16S ARN ribosomal de aislados de <i>P. multocida</i>	122
V.8. RESULTADOS GLOBALES DE LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MANNHEIMIA-BIBERSTEINIA Y <i>P. MULTOCIDA</i>	123
V.9. TIPIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE MANNHEIMIA Y BIBERSTEINIA.....	124

V.9.1. Serotipificación por Hemaglutinación Indirecta (HI).....	124
V.9.2. Factores de virulencia en aislados del Complejo M-B	128
V.10. TIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i>	143
V.10.1. Determinación de la subespecie y biotipos de <i>P. multocida</i>	143
V.10.2. Serogrupos de los aislados de <i>Pasteurella multocida</i>	147
V.10.3. Detección de los genes <i>tox</i> A, <i>pfh</i> A, <i>hgb</i> B y <i>tbp</i> A codificantes de factores de virulencia de <i>P. multocida</i>	149
V.11. SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.....	154
V.11.1. Sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de <i>Mannheimia-Bibersteinia</i>	154
V.11.2. Sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de <i>P. multocida</i>	157
V.12. RESULTADOS GLOBALES DEL AISLAMIENTO EN RELACIÓN A LAS LESIONES NEUMÓNICAS	162
V.12.1. Frecuencia de aislamiento y asociación con la presencia de lesiones neumónicas	162
V.12.2. Análisis estratificado del aislamiento de <i>M. haemolytica</i> y de <i>P. multocida</i> por muestreo.	167
V.12.3. Características de los aislados de <i>M. haemolytica</i> y <i>P. multocida</i> por pulmones.	171
V.13. ANÁLISIS FACTORIAL (“ANÁLISIS CLUSTER”) DE PULMONES	176
VI. CONCLUSIONES.....	185
VII. BIBLIOGRAFÍA	189
VIII. ANEXOS.....	215

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1: Antiguas especies incluidas en el género <i>Pasteurella</i>	11
Tabla 2: Especies pertenecientes al género <i>Pasteurella</i>	11
Tabla 3: Características bioquímicas de las tres subespecies de <i>P. multocida</i>	13
Tabla 4: Principales características de los serotipos de <i>M. haemolytica</i> *	20
Tabla 5: Principales factores de virulencia de <i>M. haemolytica</i>	22

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 6: Cepas de referencia utilizadas en las técnicas aplicadas en este estudio.	61
Tabla 7: Características bioquímicas diferenciales para la identificación de bacterias del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i>	63
Tabla 8: Concentración de los reactivos para la PCR múltiple de identificación de aislados del complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i>	65
Tabla 9: Cebadores y condiciones de las técnicas de PCR para la identificación de los aislados de <i>M. haemolytica</i> , <i>B. trehalosi</i> y <i>P. multocida</i>	66
Tabla 10: Concentración de los reactivos para la PCR de identificación de aislados de <i>P. multocida</i>	67
Tabla 11: Biotipos descritos para <i>Pasteurella multocida</i>	69
Tabla 12: Características bioquímicas de subespecies de <i>P. multocida</i>	70
Tabla 13: Pauta de inoculación de conejos.....	71
Tabla 14: Lista de cepas control utilizadas para producir antisueros y diluciones de ensayo utilizadas.....	72
Tabla 15: Volumen y concentración de reactivos en el mix de PCR para identificar el gen <i>lktA</i> . 77	
Tabla 16: Factores de virulencia estudiados en aislados del complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> .79	
Tabla 17: Cebadores y condiciones de las pruebas de PCR utilizadas para la detección de genes asociados a factores de virulencia en aislados del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> .80	
Tabla 18: Concentraciones de los reactivos utilizados en las pruebas de PCR múltiple.....	82
Tabla 19: Concentración de los reactivos para la PCR múltiple de identificación del serotipo capsular en aislados de <i>Pasteurella multocida</i>	84
Tabla 20: Cebadores y condiciones de las pruebas de PCR utilizadas para la serotipificación capsular y detección de genes asociados a factores de virulencia en aislados de <i>P. multocida</i>	85
Tabla 21: Volumen y concentración de cada reactivo en el mix de PCR múltiple para identificar los genes <i>toxA</i> , <i>tbpA</i> , <i>hgbB</i> y <i>pfhA</i>	86
Tabla 22: Lista de antibióticos evaluados en el antibiograma.	87
Tabla 23: Lista de antibióticos evaluados en el análisis de CMI.....	88

Tabla 24: Peso promedio de cada lóbulo en relación al volumen total del pulmón	90
Tabla 25: Puntuación según la extensión del área de consolidación pulmonar en cada lóbulo ..	91
Tabla 26: Área de consolidación de lóbulos pulmonares, considerándose el área consolidada y el peso relativo del lóbulo en relación al parénquima pulmonar.....	91
Tabla 27: Puntuación relativa a las categorías de volumen de consolidación pulmonar	91

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 28: Procedencia de las muestras, fecha de muestreo y numero de muestras.	96
Tabla 29: Grado de consolidación pulmonar de los pulmones analizados.....	100
Tabla 30: Colonias de la Familia <i>Pasteurellaceae</i> aisladas de pulmones de corderos en matadero clasificadas en función de las características de crecimiento.....	109
Tabla 31: Resultados de la identificación mediante pruebas bioquímicas (DIATABS®) de los aislados catalasa y oxidasa positivos, hemolíticos (colonia TH) y no hemolíticos (colonias TNH).	110
Tabla 32: Resumen de las características bioquímicas de los aislados identificados como parte del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> ^a y de las cepas patrón*.	111
Tabla 33: Resultados de la identificación con el sistema VITEK® de aislados catalasa y oxidasa positivos no hemolíticos clasificados como colonias tipo BNH y TNH.....	115
Tabla 34: Resultados de la identificación por PCR de los aislados del complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> y de <i>P. multocida</i>	118
Tabla 35: Concordancia entre las pruebas del VITEK® y la PCR para la identificación de <i>P. multocida</i> *	119
Tabla 36: Resultados de la identificación por secuenciación del 16S ARN ribosomal de aislados del Complejo <i>M-B</i>	121
Tabla 37: Identificación de aislados sospechosos de <i>P. multocida</i> por secuenciación del 16S ARN ribosomal.....	122
Tabla 38: Resultado final de identificación de los aislados del Complejo <i>M-B</i> y de <i>P. multocida</i> aislados de los pulmones de corderos teniendo en cuenta los resultados de la identificación bioquímica, la identificación por PCR y la secuenciación del 16S ARNr.	123
Tabla 39: Serotipos capsulares detectados en los aislados identificados como parte del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i>	125
Tabla 40: Asociación entre la producción de de hemólisis y la detección del gen <i>lktA</i> codificante de la región activa de la leucotoxina en los 488 aislados del complejo <i>M-B</i>	129
Tabla 41: Detección de genes de virulencia en cepas patrón del complejo <i>M-B</i> utilizadas en este estudio.....	133
Tabla 42: Genes detectados en cada uno de las bacterias identificadas del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i>	135
Tabla 43: Distribución de los factores de virulencia de acuerdo a los serotipos capsulares entre los 488 aislados del Complejo <i>M-B</i>	136
Tabla 44: Resultados de la PCR de detección de los tres subtipos del gen <i>tbpB</i> en los aislados de <i>Mannheimia</i> y <i>B. trehalosi</i> por serotipos.	139

Tabla 45: Perfiles genéticos en aislados del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> basados en la detección de genes de virulencia.	141
Tabla 46: Frecuencia de perfiles genéticos en cada uno de las bacterias del Complejo <i>M-B</i> identificadas.....	142
Tabla 47: Subespecie, biotipos y serotipo capsular de 87 aislados de <i>P. multocida</i>	144
Tabla 48: Características de los nuevos biotipos de <i>P. multocida</i> descritos en los aislados obtenidos a partir de pulmones de corderos.	145
Tabla 49: Distribución de los factores de virulencia de acuerdo a los serotipos capsulares entre los 87 aislados de <i>P. multocida</i>	150
Tabla 50: Asociación entre los perfiles genéticos (genes de virulencia) y el serotipo capsular y la subespecie de <i>P. multocida</i>	151
Tabla 51: Porcentajes de resistencia encontrados en los aislados de campo del complejo <i>M-B</i> 154	
Tabla 52: Fenotipos resistentes detectados en aislados de campo del Complejo <i>M-B</i> *	155
Tabla 53: Número de resistencias a los antibióticos en cada una de las especies identificadas	156
Tabla 54: Porcentajes de resistencia encontrados en los aislados de campo de <i>P. multocida</i> ..	158
Tabla 55: Fenotipos resistentes encontrados en los aislados de <i>P. multocida</i>	159
Tabla 56: CMI's de los 87 aislados de <i>P. multocida</i> a los 18 antibióticos estudiados.	160
Tabla 57: Asociación del crecimiento bacteriano de la familia <i>Pasteurellaceae</i> con la presencia de lesiones neumónicas y el grado de consolidación pulmonar.	163
Tabla 58: Frecuencia de aislamiento de distintas especies bacterianas de la Familia <i>Pasteurellaceae</i> por pulmones.	163
Tabla 59: Combinaciones de especies del complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> por pulmones..	167
Tabla 60: Frecuencia de aislamiento y asociación con las lesiones neumónicas de <i>M. haemolytica</i> estratificado por muestreo.	168
Tabla 61: Frecuencia de aislamiento y asociación con las lesiones neumónicas de <i>P. multocida</i> estratificado por muestreo.	169
Tabla 62: Frecuencia de aislamiento de cada serotipo en relación al total de pulmones analizados y al total de pulmones con y sin lesiones neumónicas.	171
Tabla 63: Asociación de los serotipos A y D con la presencia de lesiones neumónicas.....	176
Tabla 64: Resultados del análisis factorial de los 263 pulmones estudiados.....	178
Tabla 65: Asociación las lesiones neumónicas y los clusters detectados en el análisis factorial.	182
Tabla 66: Distribución de los clusters por muestreo.	183

ÍNDICE DE FIGURAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 1: Esquema de selección de colonias de <i>Pasteurellaceae</i>	59
Figura 2: Esquema del procedimiento de HI para titular anticuerpos.....	76
Figura 3: Esquema del procedimiento de HI para detectar antígenos	76
Figura 4: Esquema de pulmón que indica el porcentaje atribuible a cada lóbulo.....	90

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 5: Pulmones de corderos sacrificados en matadero con lesiones neumónicas. Consolidación pulmonar cráneoventral.....	98
Figura 6: Detalle de la zona cráneoventral de un pulmón con lesiones neumónicas. La zona de consolidación se caracteriza por la consistencia más firme.	98
Figura 7: Presencia exudado purulento en bronquios en la zona de consolidación pulmonar. ...	99
Figura 8: Presencia de edema interlobulillar.	99
Figura 9: Distribución de las puntuaciones de consolidación pulmonar en cada muestreo en relación al aislamiento de bacterias de la familia <i>Pasteurellaceae</i>	101
Figura 10: Bronconeumonía supurativa (H&E). 20X. Exudado en la luz bronquiolar con predominancia de PMN y macrófagos. También pueden observarse detritus celulares, eritrocitos extravasados y edema. Hiperplasia de células caliciformes. ...	104
Figura 11: Hiperplasia de tejido linfoide peribronquiolar (H&E). A). 2X. Activación de tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), abundante infiltración de linfocitos en septos interalveolares. B). Detalle (10X). Presencia de linfocitos inmaduros infiltrados en el tejido ocluyendo la luz del bronquiolo. Esta imagen es típica de procesos crónicos.	104
Figura 12: Bronquiolitis obliterante (tinción de Masson). A) 2X. Observese la abundante infiltración de tejido conectivo (teñido de azul) en el parenquima pulmonar, lo que indica la cronicidad de la lesión. B) 20X. Fibroplasia de un bronquiolo, detalle de la proliferación de tejido conectivo alrededor de bronquiolos que oblitera la luz del bronquiolo.	105
Figura 13: Pulmón. 40X (H&E). Foco de necrosis en tejido pulmonar rodeado de una abundante infiltración de células de tipo inflamatorio. Pérdida de la estructura normal del tejido, los septos interalveolares están rotos y distendidos.....	105
Figura 14: Crecimiento bacteriano de colonias de <i>M. haemolytica</i> en agar sangre Columbia: colonias translúcidas productoras de hemólisis total.....	107
Figura 15: Crecimiento bacteriano de colonias de <i>P. multocida</i> en agar sangre Columbia: colonias blanquecinas no hemolíticas de olor característico.	108
Figura 16: PCR de identificación de aislados del complejo <i>M-B</i> . Gel de agarosa al 1%. Línea 1: Marcador de peso molecular Sigma Aldrich (3000 bp), línea 2: Control Positivo de <i>M. haemolytica</i> (CECT924) 266bp, línea 3: control positivo de <i>B. trehalosi</i> (NCTC10370) 143bp, línea 4: control negativo, líneas 5-19: aislados sospechosos del complejo <i>M-B</i> .	116

- Figura 17: PCR de identificación de *P. multocida*. Gel de agarosa al 2%. Línea 1: Marcador de peso molecular, línea 2: control positivo de *P. multocida* cepa CECT4325 (460bp), línea 3: control negativo, líneas 4 – 8: aislados sospechosos de *P. multocida*. 117
- Figura 18: PCR de detección del gen *lktA*. Gel de agarosa al 1%. Líneas 1 y 10: Marcador de peso molecular Roche (12,2kbp), línea 2: Control Positivo de *M. haemolytica* (CECT924) 1145bp, línea 3: control negativo, líneas 4-9: aislados del Complejo M-B. 128
- Figura 19: PCR múltiple de identificación de factores de virulencia – FV1 (genes *irp* 1025bp, *gcp* 912 bp, *sodA* 624bp, *pomA* 310bp y *sodC* 230bp). Gel de agarosa al 1,5%, 70V. Líneas 1 y 20: Marcador de peso molecular (3000bp) Sigma Aldrich, línea 2: Control positivo de los cinco genes cepa de *M. haemolytica* CECT924, línea 3: control negativo, líneas 4 – 19: aislados de campo de *M. haemolytica*. 131
- Figura 20: PCR múltiple de identificación de factores de virulencia – FV2 (genes *tbpB1* 1221bp, *nanH* 660bp, *tonB* 504bp, *tbpA* 285bp y *fhaC* 207bp). Gel de agarosa al 1,5%. Líneas 1 y 20: Marcador de peso molecular (3000bp), línea 2: Control positivo de los genes (*nanH*, *tonB*, *tbpA* y *fhaC*) cepa de *M. haemolytica* CECT924, línea 3: control positivo de los genes (*tbpB1*, *tonB*, *tbpA* y *fhaC*) cepa PH344 de *Mannheimia glucosida*, línea 4: control negativo, líneas 5 – 19: aislados de campo de *Mannheimia haemolytica*. 131
- Figura 21: PCR múltiple de identificación de factores de virulencia – FV3 (genes *hf* 621bp, *plpD* 436bp, *lpsA* 385bp, *pilA* 311bp, y *adhes* 155bp). Gel de agarosa al 1,5%, 70V. Líneas 1 y 15: Marcador de peso molecular (3000bp), línea 2: Control positivo de los cinco genes cepa de *M. haemolytica* CECT924, línea 3: control negativo, líneas 4 – 14: aislados de campo de *M. haemolytica*. 132
- Figura 22: PCR múltiple de identificación de factores de virulencia – FV2 (genes *tbpB2* 1046bp y *tbpB3* 933bp). Gel de agarosa al 1,5% 70V. Líneas 1 y 7: Marcador de peso molecular (3000bp), línea 2: Control positivo del gen *tbpB2* cepa de *M. haemolytica* CECT924, línea 3: control positivo del gen *tbpB3* cepa NCTC10639 de *B. trehalosi*, línea 4: control negativo, líneas 5 y 6: aislados de campo del Complejo M-B. 138
- Figura 23: PCR múltiple de identificación de serogrupos capsulares de *P. multocida* (*capA* 1044 bp, *capB* 760 bp, *capD* 657 bp, *capE* 511 bp y *capF* 851 bp). Gel de agarosa al 2%. Línea 1: Marcador de peso molecular (3000bp), línea 2: Control positivo serogrupo A (NCTC10322), línea 3: Control positivo serogrupo B (NCTC10323), línea 4: control positivo serogrupo D (CECT4325), línea 5: control positivo serogrupo E (NCTC10326), línea 6: control positivo serogrupo F (C2040103), línea 7: control negativo, líneas 8 – 15 aislados de campo de *P. multocida*. 148
- Figura 24: PCR múltiple de identificación de genes de virulencia (*toxA* 865bp, *tbpA* 728bp, *hgbB* 500bp y *pfhA* 276bp) de *P. multocida*. Gel de agarosa al 1,5%. Líneas 1 y 20: marcador molecular (3000bp), línea 2: Control positivo de gen *pfhA* (NCTC10322), línea 3: control positivo de los genes *toxA*, *tbpA*, *hgbB* y *pfhA* (CECT4325), línea 4: control negativo, líneas 5 -19: aislados de campo de *P. multocida*. 149
- Figura 25: Distribución de las puntuaciones de consolidación pulmonar obtenidas para cada pulmón de acuerdo al muestreo y a la categoría de complejo respiratorio. 164
- Figura 26: Frecuencia de la infección simple y mixta de serotipos de *M. haemolytica* detectados en pulmones sin lesiones neumónicas (N=112). 172
- Figura 27: Frecuencia de la infección simple y mixta de serotipos de *M. haemolytica* detectados en pulmones con lesiones neumónicas (N=151). 172

Figura 28: Frecuencia de detección del gen *irp* en relación en pulmones con y sin lesiones neumónicas..... 174

Figura 29: Frecuencia de aislamiento de serotipos de *P. multocida* en los pulmones analizados por lote de muestreo 175

ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
BALT	Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CLI	Clindamicina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CTET	Clortetraciclina
DANO	Danofloxacin
ENRO	Enrofloxacin
ET	Electroforetic types
FFN	Florfenicol
Fur	Ferric uptake regulator
GEN	Gentamicin
H-E	Hematoxilina-Eosina
Hgb	Hemoglobin binding protein
HI	Hemaglutinación indirecta
ICSP	International Committee on Systematics of Prokaryotes
IROMP	Iron-regulated outer membrane proteins
LBSN	List of Bacterial names with Standing in Nomenclature
LFA-1	Lymphocyte-function-associated antigen 1
Lkt	Leucotoxin
LPP	Lipoproteínas
LPS	Lipopolisacárido
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
NCTC	National Collection of Type Culture
NEO	Neomicin
NPG	Nitrophenyl- α -D-glucoside (β -glucosidase)
NT	No tipificable
ODC	Ornithine decarboxylase activity
OMP	Outer membrane protein
ONPF	O-nitrophenyl α -D-fucopyranoside (α -fucosidase)
ONPG	Orto nitro piro-galactósido

OXY	Oxitetraciclina
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEN	Penicilina
PME	Proteínas de membrana externa
PMN	Polimorfonucleares
PM-PCR	PCR para <i>Pasteurella multocida</i>
RTX	Repeats in toxin
SDM	Sulfadimetoxina
SMT	Signature-tagged mutagenesis
SPE	Espectinomycin
SsaI	Serotype A1 specific antigen
SXT	Sulfametoazol-trimetoprim
Tbp	Transferrin binding protein
TIA	Tiamulina
TIL	Tilmicosina
TLR	Toll-like receptor
TUL	Tulatromicina
TYLT	Tartrato de tilosina
XNL	Ceftiofur

RESUMEN

La Pasteurelosis neumónica ovina es un proceso complejo en cuanto a su etiología, diagnóstico clínico y su control en la granja. En los corderos la enfermedad puede tener un curso agudo y el brote puede iniciarse en la granja con la aparición de muertes súbitas. Los corderos que sobreviven pueden recuperarse o evolucionar a una forma subclínica, caracterizada por el desarrollo de una bronconeumonía crónica, reduciéndose la capacidad pulmonar y la eficiencia en la ganancia en peso. En el ganado ovino, representa una de las principales causas de pérdidas económicas, debido a la elevada morbilidad, gastos en tratamiento y a su influencia negativa en la ganancia en peso de los corderos.

La etiología de la Pasteurelosis neumónica en ovino es de naturaleza multifactorial. Diversos factores concurrentes interaccionan para causar enfermedad: factores propios del hospedador (inmunológicos, fisiológicos, etc.), agentes infecciosos (virus, bacterias y micoplasmas), factores ambientales y de manejo. *Mannheimia haemolytica*, antes denominada *Pasteurella haemolytica*, es considerada el principal agente etiológico de la Pasteurelosis neumónica ovina (Gilmour y Gilmour, 1989b, 1989a), mientras que los casos de Pasteurelosis neumónica en ovejas ocasionados por *P. multocida* tienden a ser esporádicos y poco se sabe de la epidemiología de esta infección (Quinn *et al.*, 2002).

El objetivo de esta tesis fue la tipificación fenotípica y genotípica de aislados de *M. haemolytica* y *P. multocida* asociados a la presencia de lesiones neumónicas en los corderos de cebo sacrificados en matadero. Se analizaron 263 pulmones de corderos, 151 con lesiones neumónicas y 112 sin lesiones, obtenidos en ocho muestreos realizados en tres mataderos de la Comunidad de Madrid. Los corderos provenían de explotaciones de las Comunidades Autónomas de Madrid y Extremadura.

La frecuencia de aislamiento de bacterias de la familia *Pasteurellaceae* fue alta en los pulmones con lesiones neumónicas (68,90%) y de los pulmones sin lesiones (31,10%) y su aislamiento se asoció a la presencia de las lesiones (OR 3,56; IC95% 2,11-6,00). En total, se analizaron 603 aislados de la familia *Pasteurellaceae*, procedentes de 170 pulmones con y sin lesiones, que se identificaron mediante pruebas bioquímicas individuales (DIATABS®) y/o el sistema VITEK®, PCR's de identificación y secuenciación del 16S ARNr cuando fue necesario. Se identificaron 456 aislados de *M. haemolytica*, 17 de *M. glucosida*, 12 de *M. ruminalis*, 2 de *M. varigena*, 1 de *B. trehalosi* y 87 de *P. multocida*.

Los aislados del complejo *Mannheimia-Bibersteinia* (488 aislados) se tipificaron fenotípicamente mediante la utilización de 16 pruebas bioquímicas y la determinación del serotipo capsular por hemaglutinación indirecta y genotípicamente mediante la detección por PCR de 16 genes (*lktA*, *adhes*, *fhaC*, *gcp*, *hf*, *irp*, *lpsA*, *nanH*, *pilA*, *plpD*, *pomA*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *tbpB* y *tonB*) codificantes de factores de virulencia. Los resultados de las pruebas bioquímicas y de la serotipificación indican que existe una gran diversidad fenotípica en los aislados del complejo *M-B*. Los serotipos más frecuentes fueron el A7 (12,7%) y el A6 (10,5%) seguidos del A9 (8,4%), el A12 (7,8%), el A5 (6,6%), el A2 (4,7%) y el A8 (4,7%). Otros serotipos detectados con una frecuencia menor al 4% fueron A1, A11, A13, A14 y A17. El 37,9% (185/488) fue no tipificable (NT). Más del 90% de aislados de *Mannheimia* fueron positivos a los genes *lktA*, *adhes*, *fhaC*, *nanH*, *pilA*, *sodA*, *tbpA*, *tbpB* y *tonB*; entre 60% - 90% fueron positivos a *gcp*, *hf*, *irp*, *lpsA*, *plpD* y *pomA*; y el gen menos frecuente fue el *sodC* (17,4%). Los aislados de *M. haemolytica* positivos al gen *irp* se asociaron a la presencia de lesiones neumónicas. La presencia del gen *sodC* y del tipo 2 del gen *tbpB* se asoció a los serotipos A2 y A7, considerados los más frecuentes en la pasteurelosis neumónica ovina. El 81,6% de los aislados se agrupó en 23 perfiles genéticos distintos en función de la presencia o ausencia de los genes de virulencia investigados. Los perfiles genéticos mayoritarios de *M. haemolytica*, genotipos 1 (24,2%) y 2 (17,2%), fueron negativos al gen *sodC* y se diferencian en la ausencia o presencia del gen *irp* respectivamente. Los aislados de *Mannheimia* presentaron altos porcentajes de resistencia a los antibióticos de la familia de los macrólidos, tilosina (90,4%) y eritromicina (19,8%). Otras resistencias encontradas con menos del 5% de frecuencia fueron a tetraciclina, gentamicina, penicilina, ceftiofur y enrofloxacin. Todos los aislados de *Mannheimia* fueron sensibles a florfenicol.

Los 87 aislados de *P. multocida* se clasificaron en dos subespecies: *multocida* (35,6%) y *septica* (64,4%). De los 14 biotipos de *P. multocida* descritos hasta el momento, se identificaron los biotipos 1, 4, 6, 7 y 10. Adicionalmente se pudieron detectar 10 biotipos nuevos, clasificados del 15 al 24. El biotipo más frecuente entre los 87 aislados de *P. multocida* de este estudio fue el biotipo 19 (34,5%) asociado a la subespecie *P. multocida septica*, seguido del biotipo 4 (21,80%) asociado a la subespecie *P. multocida multocida*. Se determinó el serogrupo capsular por la técnica de PCR múltiple que detecta los cinco genes capsulares (*capA*, *capB*, *capD*, *capE* y *capF*). El 60,9% (53/87) de los aislados pertenecían al serogrupo A, el 35,6% (31/87) al serogrupo D y el 3,4% (3/87) fue negativo a los cinco serogrupos (CAP-). El serogrupo A se asoció a la subespecie *septica* y el serogrupo D a la subespecie *multocida*. Los cuatro principales factores asociados a la virulencia de *P. multocida* fueron identificados mediante la detección por PCR de sus genes codificantes (*toxA*, *pfhA*, *hgbB* y *tbpA*). La mayoría de los

aislados fueron positivos a la presencia del gen *toxA* (75,9%) y al gen *tbpA* (97,7%). Solo el 9,2% (8/87) de los aislados fue positivo al gen *pfhA* y el 2,3% (2/87) al gen *hgbB*. La presencia del gen *toxA* se asoció al serogrupo A. El 92,5% de los aislados del serogrupo A fue positivo, aunque también se detectó en el 51,6% de los aislados del serogrupo D. La detección de fenotipos resistentes a los antibióticos fue alta en *P. multocida*. El 100% de los aislados fue resistente al menos a un antibiótico y el 81,6% fue multirresistente. Los porcentajes de resistencia más altos se detectaron para clindamicina, tilosina y sulfadimetoxina.

M. haemolytica se aisló en el 52,85% de los pulmones y *P. multocida* en el 27,76% y su aislamiento se asoció a la presencia de lesiones neumónicas con una OR de 2,15 (IC95% 1,31-3,55) y de 3,29 (IC95% 1,78-6,08), respectivamente. La frecuencia de aislamiento de *M. glucosida* (6,08%), *M. ruminalis* (5,32%), *M. varigena* (0,76%) y *B. trehalosi* (0,38%) fue mucho menor.

Finalmente, se realizó un Análisis Factorial (o Análisis Cluster) de diferentes variables estudiadas en las 263 muestras de pulmones, identificándose cuatro clusters. Los resultados del Análisis Factorial indican que la presencia de lesiones neumónicas en corderos en matadero se asocian a la infección por *M. haemolytica* y *P. multocida*, tanto en infección mixta como simple. La infección simple por *M. haemolytica* se asocia a los serotipos A7 y A9 y parece estar ampliamente difundida. Las infecciones simples por *P. multocida* se asociaron a los aislados del serogrupo A, toxigénicos (*toxA*⁺) y que además poseen el gen *tbpA*. Las infecciones mixtas en los pulmones se asociaron a *M. haemolytica* de los serotipos A6 y A12 y *P. multocida* de los serotipos A y D.

La frecuencia de aislamiento de *M. haemolytica* en pulmones de cordero sacrificados en matadero es relativamente alta en las zonas geográficas de procedencia de los corderos de este estudio (Extremadura y Madrid) y se asocia a la presencia de lesiones propias de la bronconeumonía crónica. El papel de *P. multocida* en la etiología de la pasteurelisis neumónica ovina podría ser más importante del que se le atribuye, al menos en los procesos crónicos o subclínicos.

SUMMARY

Ovine pneumonic pasteurellosis is a process complex in its etiology, clinical diagnosis and control on farms. This disease may present itself in an acute form in lambs and the outbreak could be initially expressed in sudden deaths in the farm. The lambs that survive may recover or develop the subclinical form, characterized by the development of chronic bronchopneumonia, decreasing the lung capacity and efficiency in weight gain. This disease is the major cause of economic losses in sheep farms, due to the high morbidity, treatment costs and its negative influence on weight gain in lambs.

The etiology of the ovine pneumonic pasteurellosis is caused by many factors. Several concurrent factors interact to cause the disease: host-specific factors (immunological, physiological, etc.), infectious agents (viruses, bacteria and mycoplasmas), environmental factors and animal management. *Mannheimia haemolytica*, previously known as *Pasteurella haemolytica*, is considered the main etiologic agent of ovine pneumonic pasteurellosis (Gilmour and Gilmour, 1989b, 1989a), while cases of pneumonic pasteurellosis caused by *P. multocida* tend to be sporadic in sheep and little is known about the epidemiology of this infection (Quinn et al., 2002).

The objective of this thesis was the phenotypic and genotypic characterization of isolates of *M. haemolytica* and *P. multocida* associated with the presence of pneumonic lesions in lambs slaughtered in an abattoir. Lungs of 263 lambs were analyzed, 151 with pneumonic lesions and 112 without lesions; samples were obtained during eight sampling periods in three abattoirs in the Community of Madrid. The lambs came from farms located in the Autonomous Communities of Madrid and Extremadura.

Isolation frequency of bacteria of the family *Pasteurellaceae* was high. It was isolated from 68.90% of lungs with pneumonic lesions, and 31.10% of lungs without lesions, and its isolation was associated with the presence of lesions (OR 3.56, 95% CI: 2.11 to 6.00). Were analyzed, 603 isolates of the *Pasteurellaceae*, from 170 lungs. Each sample was identified by individual biochemical tests (DIATABS®), and/or the VITEK® system, PCRs identification and sequencing of 16S rRNA when it was necessary. 456 isolates of *M. haemolytica*, 17 *M. glucosida*, 12 *M. ruminalis*, 2 *M. varigena*, 1 *B. trehalosi* and 87 *P. multocida* were identified.

Isolation from *Mannheimia-Bibersteinia* (M-B) complex (488 isolates) were typed phenotypically by using 16 biochemical tests and determination of capsular serotype using an

indirect hemagglutination test, and genotypically using a PCR technique to detect codifying genes of virulence factors (*lktA*, *adhes*, *fhaC*, *gcp*, *hf*, *irp*, *lpsA*, *nanH*, *pilA*, *plpD*, *pomA*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *tbpB* and *tonB*). The results of biochemical tests and serotyping showed that there is a high phenotypic diversity in bacteria isolated from *M-B* complex. The most common serotypes were A7 (12.7%) and A6 (10.5%), followed by A9 (8.4%), A12 (7.8%), A5 (6.6%), A2 (4.7%), and A8 (4.7%). Other serotypes detected with less than 4% of frequency were A1, A11, A13, A14 and A17. The 37.9% (185/488) of samples were untypeable (UT). More than 90% of *Mannheimia* isolates were positive for the genes *lktA*, *adhes*, *fhaC*, *nanH*, *pilA*, *sodA*, *tbpA*, *tbpB* and *tonB*, between 60% to 90% were positive for *gcp*, *hf*, *irp*, *lpsA*, *plpD* and *pomA* genes, and the least frequent was *sodC* (17.4%). Isolates of *M. haemolytica* positives to *irp* gene were associated with the presence of pneumonic lesions. The presence of *sodC* and *tbpB* subtype 2 were associated with serotypes A2 and A7, considered the most common in pneumonic ovine pasteurellosis. Most of the isolates (81,6%) belonged to 23 different genetic profiles based on the presence or absence of virulence genes investigated. The major genetic profiles of *M. haemolytica*, genotypes 1 (24.2%) and 2 (17.2%) were negative to *sodC* and differed on the absence or presence of gen *irp*, respectively. *Mannheimia* isolates showed high percentages of resistance to antibiotics of the family of macrolides, tylosin (90.4%) and erythromycin (19.8%). Other resistances encountered with less than 5% frequency were tetracycline, gentamicin, penicillin, ceftiofur and enrofloxacin. All *Mannheimia* isolates were susceptible to florfenicol.

The 87 isolates of *P. multocida* were classified into two subspecies: *multocida* (35.6%) and *septica* (64.4%). Biotypes 1, 4, 6, 7 and 10 of *P. multocida* were identified among the 14 biotypes describes previously. Additionally, 10 new biotypes were detected and named from number 15 to 24. Biotype 19 (34.5%) was the most frequent for the 87 isolates of *P. multocida* biotype, and it was associated with the *P. multocida* subspecies *septica*, the second most frequent was biotype 4 (21.80%) associated with the *P. multocida* subspecies *multocida*. Capsular serotype was determined by the multiple PCR technique to the five capsular genes (*capA*, *capB*, *capD*, *capE* and *capF*). 60.9% (53/87) of isolates belonged to serogroup A, 35.6% (31/87) to serogroup D and 3.4% (3/87) were negative to the five serogroups (CAP-). Serogroup A was associated with the subspecies *septica* and serogroup D to the subspecies *multocida*. The four main factors associated with the virulence of *P. multocida* were identified through the detection of gene encoding (*toxA*, *pfhA*, *hgbB* and *tbpA*) by the PCR technique. Most of the isolates were positive to the presence of *toxA* (75.9%) and *tbpA* (97.7%) genes. Only 9.2% (8/87) of the isolates were positive to *pfhA* gen and 2.3% (2 / 87) for *hgbB* gen. The presence of the *toxA* gene associated with serogroup A: 92.5% of isolates of serogroup A were positive, but it was also detected in 51.6% of serogroup D isolates. The detection of antibiotic-resistant

phenotypes was high in *P. multocida*. 100% of the isolates were resistant to at least one antibiotic and 81.6% were multiresistant. The highest resistance was against clindamycin, tylosin and sulfadimethoxine.

M. haemolytica was isolated from 52.85% and *P. multocida* from 27.76% of the lungs and its isolation was associated to the presence of pneumonic lesions with an OR of 2.15 (95% CI 1.31 to 3.55) and 3.29 (95% CI 1.78 to 6.08), respectively. The frequency of isolation of *M. glucosida* (6.08%), *M. ruminalis* (5.32%), *M. varigena* (0.76%) and *B. trehalosi* (0.38%) was lower.

Finally, a factor analysis of different variables evaluated in the 263 lung samples was performed, identifying four clusters. The Factorial Analyses (or Cluster Analyses) indicated that the presence of pneumonic lesions in lambs at slaughter was associated to infection with *M. haemolytica* and *P. multocida*, both as a simple and mixed infection. Simple infection by *M. haemolytica* serotypes was associated with A7 and A9 and was apparently widespread. Simple infections by *P. multocida* was associated with serogroup A, toxigenic (*toxA*⁺) and also presented the *tbpA* gene. Mixed infections in the lungs were associated with *M. haemolytica* serotypes of A6 and A12 and *P. multocida* serotypes A and D.

The isolation frequency of *M. haemolytica* in lungs of sheep slaughtered in an abattoir is relatively high in the geographical areas of origin of the lambs in this study (Extremadura and Madrid) and is associated with the presence of characteristic lesions of chronic bronchopneumonia. The role of *P. multocida* in the etiology of ovine pneumonic pasteurellosis may be more important than it usually is considered, at least in chronic or subclinical processes.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. GENERALIDADES

La Pasteurelosis neumónica es un proceso respiratorio de naturaleza multifactorial, que involucra miembros bacterianos de la familia *Pasteurellaceae*, que forman parte de la microbiota normal del tracto respiratorio superior de los animales. Es considerada una de las enfermedades de mayor importancia económica, que afecta principalmente a los animales de producción: aves, cerdos, bovinos, ovinos y caprinos. En el ganado ovino, representa una de las principales causas de pérdidas económicas, debido a la elevada morbilidad, gastos en tratamiento y a su influencia negativa en la ganancia de peso los corderos (Goodwin *et al.*, 2004).

El término genérico Pasteurelosis, se usa para referirse a la enfermedad (comúnmente respiratoria) causada por bacterias de la familia *Pasteurellaceae*, ahora clasificadas en los géneros *Pasteurella*, *Mannheimia* y *Bibersteinia* (CAST, 2008).

Las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* son habitantes comunes de las tonsilas y orofaringe de una gran variedad de especies domesticas y salvajes (Jaworski *et al.*, 1998). En las ovejas domesticas, bacterias de la familia *Pasteurellaceae* pueden actuar como oportunistas y causar enfermedad pulmonar después de una injuria en el pulmón por otras causas (Brogden *et al.*, 1998).

Mannheimia haemolytica, *Pasteurella multocida* y *Bibersteinia trehalosi* son las tres bacterias incluidas anteriormente en el género *Pasteurella*, que pueden ser aisladas de casos de neumonía y que originan mayor morbilidad y mortalidad en las ovejas domésticas (Gilmour y Gilmour, 1989b).

La pasteurelosis en ovejas se describe a menudo como un complejo infeccioso, que se presenta generalmente después de la invasión de los pulmones por bacterias de la familia *Pasteurellaceae* debido a un compromiso previo del tracto respiratorio. El daño previo en el tejido puede deberse a la infección por otros patógenos como el virus de Parainfluenza-3 (PI-3), adenovirus y Virus Respiratorio Sincitial (RSV por sus siglas en inglés “Respiratory Syncytial Virus”), *Chlamydia pecorum*, *Mycoplasma ovipneumoniae* y también por mecanismos irritantes por su presencia en el tejido como en el caso de los parásitos pulmonares (CAST, 2008).

La diversidad entre las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* que actúan como comensales o asociadas a la enfermedad complica los estudios epidemiológicos y el establecimiento de un programa de control eficaz. Numerosos estudios utilizando diversas técnicas de diagnóstico serológico, fenotípico y molecular han evidenciado que los ovinos pueden ser portadores de diversas cepas de *Pasteurellaceae* (Ward *et al.*, 1997; Jaworski *et al.*, 1998).

La pasteurelosis neumónica ovina, a veces denominada síndrome respiratorio ovino (SRO), es un proceso complejo en cuanto a su etiología, su diagnóstico clínico y su control en la granja. Inicialmente se describió como neumonía enzoótica y ha recibido también la denominación de neumonía crónica no progresiva (Radostits *et al.*, 2000). Fue descrita por primera vez por Dungal en 1931 (Dungal, 1931), pero hasta los años 60, con la aplicación del biotipado y serotipado, no se logró definir la epidemiología de la enfermedad (Donachie *et al.*, 1995). Es así que en 1932, se definió como principal agente etiológico del síndrome respiratorio ovino a *Pasteurella haemolytica* (actualmente *Mannheimia haemolytica*) (Newsom y Cross, 1932).

La principal característica que define la Pasteurelosis es el desarrollo de lesiones neumónicas. En los corderos la neumonía puede tener un curso agudo con fiebre, depresión y anorexia y el brote puede iniciarse en la granja con la aparición de muertes súbitas. Los corderos que sobreviven pueden recuperarse o evolucionar a una forma subclínica de curso crónico reduciéndose la capacidad pulmonar y la eficiencia en la ganancia en peso (Brogden *et al.*, 1998).

A pesar de toda la información disponible acerca de la Pasteurelosis en animales, el proceso respiratorio que ocasiona en ovinos aún no ha sido completamente esclarecido, basándose la caracterización actual en la extrapolación de la información obtenida en las diversas investigaciones realizadas en ganado bovino y en las escasas investigaciones realizadas directamente en ganado ovino. Ésta investigación pretende realizar un aporte en el conocimiento de la epidemiología molecular de la pasteurelosis neumónica en corderos, la cual contribuya a mejorar el desarrollo de vacunas que ayuden a disminuir las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad.

I.2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR: CONCEPTOS BÁSICOS Y DEFINICIONES

Con el objetivo de esclarecer y facilitar el entendimiento de los conceptos escritos en este documento, se incluye una selección de términos básicos utilizados en investigaciones relacionadas con la epidemiología molecular.

La epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas integra prácticas y principios de la biología molecular con los de la epidemiología. Ambas disciplinas utilizan enfoques analíticos para aclarar las observaciones realizadas en el mundo biológico, formular nuevos conceptos y hacer predicciones. Los enfoques analíticos utilizados en biología molecular son experimentales y de laboratorio, mientras que los utilizados en la epidemiología se obtienen de observaciones, experimentos y técnicas cuantitativas (Riley, 2004).

Higginson (1977) definió la epidemiología molecular como “la aplicación de técnicas sofisticadas para el estudio epidemiológico de material biológico”. Más recientemente Levin *et al.* (1999) escribió “Los objetivos prácticos de la epidemiología molecular son identificar los microparásitos responsables de las enfermedades infecciosas y determinar sus fuentes físicas, sus relaciones biológicas y sus vías de transmisión y las de los genes responsables de su virulencia, los antígenos relevantes para la producción de vacunas y sus resistencias a los medicamentos”.

En la epidemiología molecular el objetivo del análisis incluye el estudio del organismo por sí mismo y su interacción con el hospedador y el medio ambiente en cual habita. Diversas tecnologías y conceptos de taxonomía y filogenia pueden aplicarse racionalmente a la epidemiología molecular incluidos: (a) métodos analíticos de clasificación de cepas, (b) directrices para determinar relaciones entre cepas, (c) análisis de las relaciones evolutivas de genes específicos en agentes infecciosos (como los responsables de las resistencia a drogas y de virulencia), (d) supuestos sobre variaciones genéticas en poblaciones de patógenos y (e) opciones de escoger técnicas moleculares para clasificar cepas. La epidemiología molecular requiere especial atención tanto en las técnicas de laboratorio como en el diseño del estudio epidemiológico (Riley, 2004).

Para entender mejor los resultados de un estudio en epidemiología molecular, debemos tener claros algunos conceptos importantes utilizados, a menudo, en este tipo de estudios:

- ◇ Aislado: población de células microbianas de un cultivo puro derivadas de una simple colonia en una placa de cultivo, identificada a nivel de especie.
- ◇ Cepa: aislado o grupo de aislados que exhiben rasgos fenotípicos y/o genotípicos que pertenecen al mismo linaje, y que se distinguen de otros aislados de la misma especie.
- ◇ Clon: aislado o grupo de aislados descendientes de una cepa precursora común por reproducción no sexual que exhiben idénticos rasgos fenotípicos y genotípicos, y que cuando son caracterizados por métodos de tipado de cepas pertenecen al mismo grupo.
- ◇ Taxón: unidad taxonómica definida por un conjunto de características comunes a todos los miembros de esa unidad (ejemplo: familia, género, especies, subespecies e infraespecies).
- ◇ Tipo: específica y discreta unidad de información o característica que pertenece a una muestra sobre la que se han aplicado procedimientos de tipado de cepas (ejemplo: patrones de resistencia antibiótica, serotipos, patrones electroforéticos de bandas y alelos).
- ◇ Poder discriminatorio: habilidad de una prueba para generar distintas y discretas unidades de información de diferentes aislados, usualmente a nivel de subespecie (Riley, 2004).
- ◇ Genética Poblacional: La genética de poblaciones es el estudio de cambios evolutivos en la composición genética de las poblaciones y como los mecanismos de mutación, selección natural, migración, y deriva genética influyen esos cambios evolutivos en las poblaciones, así como la investigación histórica de cómo y cuando los patógenos han evolucionado (Whittam, 1995).

La definición de población en procariotas, a diferencia de los eucariotas donde existe un potencial para la reproducción sexual a menudo limitada por regiones geográficas y espacios de tiempo, está mejor reflejada por las relaciones clonales existentes entre

ellas y no por barreras físicas. En teoría, la estructura poblacional de los procariotas está determinada por el “rango de cambios genéticos provocados por la recombinación relativa de nuevas mutaciones” (Spratt y Maiden 1999, citado por Christensen, 2011). Si el promedio de cambios por transferencia horizontal de genes es relativamente mayor que los cambios por mutaciones puntuales, la estructura de la población será muy compleja y diversa, mientras que, un bajo grado de recombinación debido a mutaciones puntuales puede resultar en una población muy bien definida a nivel de secuencia. Solo en el último caso somos capaces de reconocer las poblaciones clonales (Christensen, 2011).

De acuerdo a una teoría, la evolución de aislados “virulentos” de procariotas puede producirse por clones con una alto nivel natural de competencia para permitir la absorción de ADN externo de otras procariotas por transferencia horizontal de genes (Maughan *et al.* 2008, citado por Christensen, 2011). Algunos linajes clonales de una especie bacteriana parecen estar adaptados a un hospedador específico. Además, estos linajes suelen causar enfermedad con mayor frecuencia que otros linajes. Por lo tanto, es importante para las investigaciones epidemiológicas, identificar y comprender la estructura poblacional de las bacterias (Christensen, 2011).

En las bacterias patógenas con una estructura de población clonal, las asociaciones no aleatorias de las propiedades de virulencia, a menudo, resultan en algunos clones y familias de clones que son más patógenos que otros, o preferentemente asociados a ciertas enfermedades o síndromes clínicos (Selander *et al.*, 1987). En consecuencia, la mayoría de los casos de enfermedades graves son causados a menudo por una pequeña proporción del total de los clones existentes (Davies *et al.*, 1997).

I. 3. ETIOLOGIA DE LA PASTEURELOSIS NEUMONICA OVINA

La etiología de la Pasteurellosis neumónica en ovino, como en la mayoría de las especies rumiantes, es de naturaleza multifactorial, estando asociada a la presentación de varios factores concurrentes que interaccionan para causar enfermedad. Así se describen factores propios del hospedador (inmunológicos, fisiológicos, etc.),

infecciosos (virus, bacterias y micoplasmas), factores ambientales y de manejo (Brogden *et al.*, 1998).

Entre las bacterias involucradas destacan las pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*: *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*. Sin embargo, *M. haemolytica* (antes denominada *Pasteurella haemolytica*) es considerada el principal agente etiológico de la Pasteurelosis neumónica ovina (Gilmour y Gilmour, 1989a), mientras que los casos de Pasteurelosis neumónica en ovejas ocasionados por *P. multocida* tienden a ser esporádicos y poco se sabe de la epidemiología de esta infección (Quinn *et al.*, 2002).

Otros microorganismos infecciosos que también se asocian a la neumonía en ovejas y que pueden estar presentes en casos de Pasteurelosis son: *Mannheimia glucosida*, *Bibersteinia trehalosi* (antes denominada *Pasteurella trehalosi*), *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma sp.*, especies de clamidias y por el grupo de los virus: Parainfluenza-3, Adenovirus, Virus Respiratorio Sincitial y virus de la Rinotraqueítis Infecciosa.

1.4. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE BACTERIAS DE LA FAMILIA PASTEURELLACEAE ASOCIADAS CON PASTEURELOSIS NEUMÓNICA OVINA

Las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* son en su mayoría ubicuas, y forman parte de la microbiota normal de tracto respiratorio, digestivo y reproductivo de diferentes mamíferos, aves, reptiles y el hombre (Christensen *et al.*, 2003). El género *Pasteurella* está conformado por un amplio grupo de especies de bacterias que se entrecruzan en sus características fenotípicas y genotípicas, por lo que desde hace varios años se han realizado investigaciones con el propósito de clasificarlas adecuadamente (Jaramillo *et al.*, 2009).

Los miembros que conforman esta familia han sufrido diversas reclasificaciones desde 1999, empezando con la introducción del nuevo género *Mannheimia*, donde se incluye y reclasifica a la antes denominada *Pasteurella haemolytica*, además de otras cuatro especies establecidas. El género *Pasteurella* también ha sido reclasificado constantemente incluyéndose y excluyéndose algunas especies bacterianas. *P.*

multocida es la especie de mayor importancia involucrada en la enfermedad respiratoria de los animales, principalmente de los bovinos (Watts *et al.*, 1994; Kehrenberg *et al.*, 2001a).

Aunque la mayoría de bacterias de la familia *Pasteurellaceae* no presenten manifestaciones clínicas constantes y su rango de hospedadores sea variable (Bisgaard, 1993), la especie animal hospedera es un indicativo para la identificación bacteriana rutinaria (Christensen *et al.*, 2004). Como sucede con otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* las infecciones se asocian predominantemente al tracto respiratorio y con menos frecuencia a septicemia (Watts *et al.*, 1994; Kehrenberg *et al.*, 2001a; Duarte y Hamdan, 2004).

1.4.1. *Pasteurella multocida*

P. multocida infecta un amplio rango de especies animales causando infecciones específicas que se manifiestan de manera diferente. Es parte de la microbiota normal de la orofaringe de muchas especies animales. Está ampliamente distribuida alrededor del mundo y es el agente causal del Cólera Aviar (aves), Septicemia Hemorrágica (bovinos), Rinitis Atrófica (cerdos), Rinitis purulenta (conejos) y otros síndromes respiratorios (en varias especies incluyendo el hombre) (Boyce, J. D. *et al.*, 2004). Adicionalmente, *P. multocida* juega un rol esencial en aumentar la severidad de las lesiones pulmonares en cerdos (Pijoan, 1999) y rumiantes (Frank, 1989). Portadores sanos y latentemente infectados son comunes en todas las infecciones por *P. multocida*, pudiendo jugar un rol clave en la epidemiología de estas infecciones (Dziva *et al.*, 2008).

1.4.1.1. Nomenclatura y taxonomía de *P. multocida*

La nomenclatura de *Pasteurella* ha sido objeto de muchos cambios desde que en 1880 Pasteur la aislara por primera vez como agente causal del cólera aviar (Fajfar-Whetstone *et al.*, 1995). En 1883, Burrill propuso el nombre científico de "*Micrococcus gallicidus*" para identificar este microorganismo (Burrill, 1883). Años más tarde, este

microorganismo fue asignado a varios géneros, incluyendo "*Bacterium*" (Ferry y Hoskins, 1920), "*Octopsis*" (Trevisan, 1885), "*Coccobacillus*" (Gamaléia, 1888) y "*Eucystia*" (Enderlein, 1917). En 1887, Trevisan propuso el nombre genérico de *Pasteurella* en conmemoración del trabajo realizado por Pasteur en esta bacteria (Trevisan, 1887).

En 1929, Topley y Wilson, propusieron el epíteto "*séptica*" para *Pasteurella* (Topley y Wilson, 1929) y el epíteto "*gallicida*" fue utilizado por Burrill en 1883 (Burrill, 1883). No fue hasta 1939, que Rosenbusch y Merchant propusieron el nombre definitivo de *Pasteurella multocida* (Rosenbusch y Merchant, 1939), sin embargo el epíteto "*multocida*" había sido utilizado por primera vez por Kitt (1893), en la combinación "*Bacterias multocidum bipolare*" (Kitt, 1893) y por Lehmann y Neumann en 1899 en el nombre de "*Bacterium multocidum*" (Lehmann y Neumann, 1899; Sneath, 1982).

Hasta 1932, el género *Pasteurella* consistió simplemente en la especie tipo: *Pasteurella multocida*. Durante los próximos 42 años, el género se amplió para incluir a *Pasteurella haemolytica* (Newsom y Cross, 1932), *Pasteurella pneumotropica* (Jawetz, 1950), *Pasteurella gallinarum* (Hall et al., 1955), *Pasteurella ureae* (Jones, 1962), *Pasteurella aerogenes* (McAllister y Carter, 1974) y *Pasteurella testudinis* (Snipes y Biberstein, 1982). Mutters et al., en 1985 reclasificaron a los miembros del género *Pasteurella* en 11 especies incluyendo a *P. multocida* (Mutters et al., 1985a). La Tabla 1, resume los antiguos miembros del género *Pasteurella*, que actualmente han sido reclasificados en otros géneros.

En el 2003, el género incluía al menos a 9 especies que corresponden a dos grupos filogenéticos separados en función al 16S ARNr, que presentan una asociación con el origen animal, básicamente en función de si el hospedador es mamífero o aviar (Dewhirst et al., 1993). Actualmente según el Subcomité de Taxonomía de *Pasteurellaceae* del ICSP (International Committee on Systematics of Prokaryotes) en la lista actualizada a Diciembre del 2009, el género *Pasteurella* incluye 13 especies (Tabla 2). Sugiriendo que debe excluirse del género a: *P. pneumotropica*, *P. aerogenes*, *P. testudinis*, *P. bettyae*, *P. caballi*, *P. mairii*, *P. skyensis* y *P. lymphangitidis* (ICSP,

2009). Esta clasificación coincide con la publicada por la “Formely List of Bacterial names with Standing in Nomenclature (LBSN)” (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

Tabla 1: Antiguas especies incluidas en el género *Pasteurella*

Especie	Referencia	Reclasificación	Referencia
<i>P. gallinarum</i>	(Hall <i>et al.</i> , 1955)	<i>Avibacterium gallinarum</i>	(Blackall <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. granulomatis</i>	(Ribeiro <i>et al.</i> , 1989)	<i>Mannheimia granulomatis</i>	(Angen <i>et al.</i> , 1999a)
<i>P. haemolytica</i>	(Newsom y Cross, 1932)	<i>Mannheimia haemolytica</i>	(Angen <i>et al.</i> , 1999a)
<i>P. anatis</i>	(Mutters <i>et al.</i> , 1985a)	<i>Gallibacterium anatis</i>	(Christensen <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. avium</i>	(Hinz y Kunjara, 1977)	<i>Avibacterium avium</i>	(Blackall <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. trehalosi</i>	(Sneath, P. H. A. y Stevens, M., 1990)	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	(Blackall <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. ureae</i>	(Jones, 1962)	<i>Actinobacillus ureae</i>	(Mutters <i>et al.</i> , 1986b)
<i>P. volantium</i>	(Mutters <i>et al.</i> , 1985b)	<i>Avibacterium volantium</i>	(Blackall <i>et al.</i> , 2005)

Tabla 2: Especies pertenecientes al género *Pasteurella*

Especie	Referencia	Hospedador
<i>P. multocida</i>	Rosenbusch y Merchant 1939	Aves, mamíferos, reptiles y humanos
<i>P. aerogenes</i>	McAllister y Carter 1974	Cerdos
<i>P. bettyae</i>	Sneath y Stevens, 1990	Humanos
<i>P. caballi</i>	Schlater <i>et al.</i> , 1990	Caballos
<i>P. canis</i>	Mutters <i>et al.</i> , 1985	Bovinos, perros, ovejas y humanos
<i>P. dagmatis</i>	Mutters <i>et al.</i> , 1985	Gatos, perros y humanos
<i>P. langaaensis</i>	Mutters <i>et al.</i> , 1985	Aves
<i>P. lymphangitidis</i>	Sneath y Stevens, 1990	Bovinos
<i>P. mairii</i>	Sneath y Stevens, 1990	Cerdos
<i>P. pneumotropica</i>	Jawetz, 1950	Roedores, gatos, perros y humanos
<i>P. skyensis</i>	Birkbeck <i>et al.</i> , 2002	Salmon
<i>P. stomatis</i>	Mutters <i>et al.</i> , 1985	Gatos, perros y humanos
<i>P. testudinis</i>	Snipes y Biberstein 1982	Tortugas

Pasteurella multocida pertenece al Phylum *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pasteurellales* y a la familia *Pasteurellaceae*, incluye 3 subespecies: *P. multocida* subespecie *multocida*, *P. multocida* subespecie *septica* y *P. multocida* subespecie *gallicida* (Mutters *et al.*, 1985a).

Un estudio realizado por Christensen *et al.* 2004, indicó similitudes genotípicas entre las cepas del biovar 2 de *P. canis* y *P. avium*, y *P. multocida*, concluyendo que ambas cepas deberían ser incluidas dentro del género *P. multocida*, ya que, a la luz de los datos, la existencia de ambos biovares en una especie aparte es altamente cuestionable (Christensen *et al.*, 2004).

I.4.1.2. Características de *P. multocida*

Las bacterias del género *P. multocida* son cocobacilos gram negativos, no móviles, con un tamaño aproximado de 0,3 – 1,0 uM de ancho y 1,0 – 2,0 uM de largo. Son positivas a la prueba de la oxidasa y catalasa, no producen hemólisis aunque puede observarse una decoloración verdosa en medios con sangre, no crecen en agar Mac Conkey ni en el medio Citrato de Simmons (Mutters *et al.*, 2005). Son anaerobios facultativos y presentan tinción bipolar con las coloraciones Giemsa y Wright (Boyce, J. D. *et al.*, 2004). Su crecimiento en medios de cultivo se ve favorecido por la adición de suero o sangre, donde a las 24 horas de incubación a 37°C se observa el crecimiento de colonias circulares, regulares, lisas y de coloración blanquecina a grisácea, de 0,5 – 2 mm de diámetro. Aislados obtenidos de rumiantes, cerdos y conejos pueden observarse como colonias grandes, acuosas o mucoides que tienden a coalescer después de 48 hrs de incubación (Mutters *et al.*, 2005).

P. multocida produce ácido de D-manitol, indol y descarboxila la ornitina (ODC), da reacciones negativas a la utilización de maltosa y dextrina. Las tres subespecies: *multocida*, *septica* y *gallicida*, son diferenciadas fenotípicamente en base a la fermentación de dos azúcares: sorbitol y dulcitol (Tabla 3). Se han reportado grandes diferencias entre sus características fenotípicas (Heddleston, 1976; Bisgaard *et al.*, 1991) llevando a una confusión en la definición e identificación del microorganismo.

Variaciones fenotípicas han sido reportadas por Fegan *et al.* (1995). En un estudio realizado en aves describieron 10 biotipos (1 al 10), asignaron cinco biotipos a la subespecie *multocida*, dos biotipos a la subespecie *septica* y un biotipo a la subespecie *gallicida*, otros dos biotipos fueron considerados atípicos por dar reacciones negativas a las pruebas ODC y maltosa (Petersen *et al.*, 1998). Cabe resaltar que en el estudio

realizado por Fegan *et al.* (1995), se reclasificaron en los biotipos 1, 2, 3 y 10, los cuatro biotipos iniciales (A, B, C y D) descritos por Blackall *et al.* (1995) (Blackall *et al.*, 1995; Fegan *et al.*, 1995). Posteriormente en 1997, Blackall *et al.*, describieron tres nuevos biotipos (12, 13 y 14) encontrados en cepas aisladas de cerdos (Blackall *et al.*, 1997).

Tabla 3: Características bioquímicas de las tres subespecies de *P. multocida*

Subespecie	Dulcitol	D-Sorbitol	L-Fucosa	Trealosa	α -glucosidasa (PNPG)	Indol	D-xilosa	D-Manitol	ODC
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	-	+	d	D	D	+	D	+	+
<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	-	-	d	+	+	+	D	+	+
<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	+	+	-	-	-	+	D	+	+

d. 11 – 89% de cepas positivas, * resultado varía dependiendo del biotipo.

Genotípicamente, se han establecido relaciones filogenéticas entre las tres subespecies, en base a métodos genotípicos que incluyen hibridaciones ADN-ADN, comparación de secuencias del 16S ARNr y de genes “housekeeping” (*rpoB*, *infB* y *atpD*) y ribotipado entre otras (Kuhnert *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2005; Kuhnert y Korczak, 2006). Se identificaron tres “clusters” (agrupaciones), que mostraron similitudes entre 84-100% para cepas identificadas como *P. multocida* subespecie *multocida*, 91-100% para cepas identificadas como *P. multocida* subespecie *septica* y 89-100% para cepas identificadas como *P. multocida* subespecie *gallicida* (Mutters *et al.*, 1985a).

Existe controversia entre los investigadores sobre las características genotípicas y las relaciones filogenéticas existentes entre las tres subespecies. Mutters *et al.* 1985, basándose en la técnica de hibridización de ADN-ADN, observaron un bajo nivel de unión (55%) entre la subespecie *multocida* y *septica*, 67% entre *septica* y *gallicida*, y 77% entre *gallicida* y *multocida*, concluyendo que estos bajos niveles de hibridización de ADN observado entre los tres grupos, podrían permitir separarlos en tres nuevas

especies, pero, que para facilitar los estudios clínicos y epidemiológicos se mantuvo el estatus de especie de *P. multocida* (Mutters *et al.*, 1985a). Sin embargo, Blackall *et al.*, (1998) en un estudio basado en los métodos de Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE por sus siglas en inglés “*Multilocus Enzyme Electrophoresis*”) y ribotipado, encontraron una íntima relación entre las cepas tipo de *P. multocida* subespecie *multocida* y *gallicida*, mientras que, la subespecie *septica* fue lejanamente relacionada con este taxón (Blackall *et al.*, 1998).

Kuhnert *et al.* (2000) y Petersen *et al.* (2001) encontraron al menos un 98,5% de similitud entre las cepas de *P. multocida* subespecie *multocida* y *P. multocida* subespecie *septica*, datos corroborados por el estudio de Christensen *et al.* (2005) en base a métodos de secuenciamiento de 16S ARNr donde se determinó un 99.9% de similitud de las cepas estudiadas con la cepa tipo de *P. multocida* subespecie *multocida* y 98,6% de similitud con la cepa tipo de *P. multocida* subespecie *septica*, incluso dos cepas fenotípicamente identificadas como *P. multocida* subespecie *septica* tuvieron un alto grado de similitud con la cepa tipo de *P. multocida* subespecie *multocida* (Kuhnert *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2001a; Christensen *et al.*, 2005).

La secuencia completa del genoma de *P. multocida* se ha determinado en base a la secuenciación de la cepa PM70 (May *et al.*, 2001). Contiene un cromosoma circular simple de 2,257,487 bp y codifica 2,015 fragmentos de lectura abierta (ORF's), 6 operones de ARNr y 57 ARNt a diferencia de la cepa PBA100 (serotipo A1) que solo tiene 5 ARNr y un tamaño estimado de 2,35 Mbp (Hunt *et al.*, 1998). Además, posee un contenido de G+C entre 37,7 a 45,9% (Mutters *et al.*, 2005).

I.4.1.3. Serotipificación

P. multocida se clasifica en diversos serotipos en base a la estructura de la cápsula y del lipopolisacárido (LPS). La determinación del serotipo se realiza utilizando las técnicas de hemaglutinación indirecta y precipitación en agar gel (Heddlestone *et al.*, 1972a; Rimler y Rhoades, 1989). La técnica de Hemaglutinación Indirecta (HI) ha sido utilizada tradicionalmente para clasificarla en cinco serotipos capsulares: A, B, D, E y F, mientras que, la técnica de precipitación en agar gel la divide en 16 (1 - 16) serotipos

somáticos (Carter, 1955; Heddlestone *et al.*, 1972b; Heddlestone y Rebers, 1972c; Rimler y Rhoades, 1987). En ocasiones se aíslan cepas acapsuladas y/o no clasificables en ningún serotipo, especialmente en aves (Rhoades y Rimler, 1987; Wilson *et al.*, 1993).

Ciertas enfermedades están asociadas al serotipo capsular, es así que el serotipo A y en menor proporción el D, se asocia con mayor frecuencia al Cólera aviar (Rimler y Rhoades, 1989) y a la Rinitis atrófica de los cerdos (principalmente las cepas toxigénicas del serotipo D) (Gwatkin y Dzenis, 1953; Nakai *et al.*, 1984; Pedersen y Elling, 1984; Rhodes *et al.*, 1987; Frymus *et al.*, 1989); el F se aísla predominantemente de aves enfermas, mayormente patos, y recientemente se aisló de un caso fatal de peritonitis fibrinosa en un ternero (Rimler y Rhoades, 1987; Catry *et al.*, 2005a); los serotipos B y E, se asociaron principalmente a la Septicemia hemorrágica de los bovinos (Carter, 1963; Baxi *et al.*, 1970; Penn y Nagy, 1974; Nagy y Penn, 1976; Francis *et al.*, 1980; Bastianello y Jonker, 1981; Hassan y Mustafa, 1985); y el serotipo A se aísla frecuentemente de animales con síndrome respiratorio y a nivel mundial es una de las mayores causas del síndrome respiratorio bovino (BRD) (Rimler y Rhoades, 1989; Christensen *et al.*, 2004).

1.4.2. *Mannheimia haemolytica*

M. haemolytica es parte de la microbiota normal del tracto respiratorio superior y nasofaringe de los rumiantes, es el principal agente etiológico del síndrome respiratorio ovino, también denominado pasteurelosis neumónica y está considerado como uno de los patógenos que causa grandes pérdidas económicas en la industria ovina.

1.4.2.1. Nomenclatura y Taxonomía de *M. haemolytica*

M. haemolytica es miembro de la familia *Pasteurellaceae*, genero *Mannheimia*. Fue clasificada inicialmente como *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt (Kitt, 1885 en (Rice *et al.*, 2007). Fue reclasificada en 1932 como *Pasteurella haemolytica* en base a su capacidad para producir hemólisis en placas de agar suplementado con

sangre del cordero y clasificada en dos biotipos A y T en base a su habilidad por fermentar la arabinosa o la trealosa, respectivamente (Newsom y Cross, 1932).

En 1960 fue clasificada en 16 serotipos en base a sus antígenos capsulares (Biberstein *et al.*, 1960). En 1985, estudios realizados con métodos de hibridización ADN-ADN excluyeron a *P. haemolytica* del genero *Pasteurella sensu stricto* (s.s.) (Mutters *et al.*, 1985a). En 1995, se caracterizó un nuevo serotipo, el A17, aislado de ovejas en Siria (Younan y Fodor, 1995).

Estudios realizados en esta especie utilizando técnicas de hibridización ADN-ADN y de secuenciación del 16S ARN ribosomal, determinaron una nueva reclasificación de este microorganismo. Los serotipos del biotipo A fueron asignados a la nueva especie *Mannheimia haemolytica* excepto el serotipo A11 que fue reclasificado dentro de la nueva especie *Mannheimia glucosida* (Angen *et al.*, 1999a). En 1990, *P. haemolytica* biotipo T fue reclasificada como *Pasteurella trehalosi* (Bingham *et al.*, 1990; Sneath, P. H. y Stevens, M., 1990), y en el 2007 fue reclasificada como *Bibersteinia trehalosi* (Blackall *et al.*, 2007).

Según la clasificación propuesta por Angen *et al.* (1999) el género *Mannheimia* comprende actualmente cinco especies distintas: *M. haemolytica* (serotipos A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16 y A17) aisladas de diversos procesos patológicos en rumiantes; *M. granulomatis* (incluye cepas previamente clasificadas como *P. granulomatis* Bisgaard taxón 20, *P. haemolytica* biogrupo 3J, y cepas clasificadas genéticamente como *P. haemolytica*-like (parecidas a *P. haemolytica*) aisladas de conejos, liebres y bovinos; *M. glucosida* (que incluye cepas clasificadas anteriormente como *P. haemolytica* biogrupos 3 A-H y 9 y cepas del serotipo A11 de *P. haemolytica*) aisladas de la cavidad nasal de corderos y en casos de mastitis; *M. ruminalis* (que incluye cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* previamente descritas como *Actinobacillus lignieresii* y *P. haemolytica* biogrupo 3J) aislada del rumen de bovinos y ovinos, no estando asociada a procesos patológicos, aunque recientemente ha sido aislado de ovejas con mastitis (Omaleki *et al.*, 2010); *M. varigena* (incluye cepas originalmente clasificadas como *P. haemolytica* biogrupo 6 y Bisgaard taxón 15 y 36) aisladas de bovinos y porcinos asociadas a sepsis, neumonía y otros procesos patológicos; y además

comprende un grupo heterogéneo de aislados genéticamente distintos de los anteriores que se denomina como *Mannheimia* spp. (Angen *et al.*, 1999a; Angen *et al.*, 1999b; Highlander, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005; Omaleki *et al.*, 2010).

Aunque *P. haemolytica* se clasifica actualmente en tres especies distintas, *M. haemolytica*, *M. glucosida* y *P. trehalosi*, para propósitos de identificación y serotipificación siguen siendo tratadas como una sola especie (Odugbo *et al.*, 2003).

I.4.2.2. Características de *M. haemolytica*

M. haemolytica es una bacteria de tinción bipolar, gram negativa, presenta cápsula y es anaerobia facultativa, tiene forma cocobacilar y mide 1-2 x 0.5 µm. Es no móvil, oxidasa y catalasa positiva, fermenta la glucosa y los carbohidratos, produciendo ácido pero no gas. Su rango de crecimiento se da en temperaturas entre los 22 y 44°C, con un crecimiento óptimo a 37°C. Es negativa a la prueba de Voges-Proskauer, a la prueba de indol y a la prueba de la gelatinasa (Mutters *et al.*, 2005).

Crece en medios enriquecidos con sangre como el agar sangre y el agar chocolate, formado colonias lisas de color blanco grisáceo con tamaño de 1 a 2 mm. de diámetro después de 24 horas de incubación. La mayoría de las cepas producen β-hemólisis; además crecen en agar Mac Conkey. Es capaz de fermentar D-sorbitol, D-xilosa, maltosa y dextrina, no fermentan la arabinosa y los glucósidos y la mayoría son negativas a la prueba de la ornitina descarboxilasa y NPG (β-glucosidasa) pero positivas a la prueba de ONPF (α-fucosidasa) (Mutters *et al.*, 2005).

Posee un genoma circular de doble cadena de ADN de 2,4 Mbp, con un porcentaje de contenido de G+C del 40%. Ocasionalmente un plásmido de 4,2 Kb, puede ser encontrado en algunas cepas, el cual es responsable de la existencia de cepas con fenotipo resistente a sulfonamidas y estreptomicina (Boyce, J. R. *et al.*, 2004; Jaramillo *et al.*, 2009).

Es necesaria una caracterización fenotípica y genotípica para la correcta clasificación de los aislados. La caracterización fenotípica de las especies del genero *Mannheimia* puede realizarse de forma rápida y sencilla utilizando las tabletas diagnósticas de

DIATABS® (ROSCO). Las pruebas detectan enzimas preformadas en suspensiones bacterianas y no son dependientes del crecimiento bacteriano (Angen *et al.*, 2002).

1.4.2.3. Serotipificación de *M. haemolytica*

Biberstein *et al.* en 1960, desarrolló un sistema de serotipificación de la antigua *P. haemolytica* basado en la hemaglutinación indirecta (HI) de antígenos capsulares solubles, clasificándola en 16 serotipos (Biberstein *et al.*, 1960). En 1962, Biberstein y Gills informaron sobre una asociación consistente entre los biotipos y los serotipos. Así el biotipo A comprendía 12 serotipos (A1, A2, A5 – A9, A11 – A14 y A16) y el biotipo T comprendía 4 serotipos (T3, T4, T10 y T15) (Smith, 1961; Biberstein, 1978). En 1983, el método fue modificado para hacerlo más fácil y rápido (Fraser *et al.*, 1983), siendo desde entonces el método más utilizado.

Además en 1995 se incluyó el serotipo A17 (Younan y Fodor, 1995). Actualmente *M. haemolytica* comprende 12 serotipos, A1, A2, A5 – A9, A12 - A14, A16 y A17, el serotipo A11 ha sido reclasificado en *M. glucosida* y como *B. trehalosi* los serotipos incluidos anteriormente en *P. trehalosi* (T3, T4, T10 y T15) (Angen *et al.*, 1999a; Kirkan y Kaya, 2005). Adicionalmente el 10% de aislados de *M. haemolytica* obtenidos de rumiantes enfermos pueden ser no serotipificables (NT: no tipificable)(Fraser *et al.*, 1982b; Quirie *et al.*, 1986).

Cepas de *M. haemolytica* no serotipificables (NT), se pueden aislar con frecuencias variables, a veces altas, dependiendo de la fuente de aislamiento (Fraser *et al.*, 1982b). La mayoría de cepas NT parecen corresponder al serotipo A (Frank, 1980), y se han descrito como mutantes de *M. haemolytica*, algunas de las cuales presentan deficiencias en la producción de antígenos solubles (Gentry *et al.*, 1988). El estudio realizado por Frank, *et al.* (1982) sugiere que la incapacidad de la técnica de Hemaglutinación Indirecta (HI) en serotipificar estos aislados, pueda deberse a la pérdida de antígenos serotipo-específicos en la superficie celular de la bacteria, dificultando la serotipificación de aislados que probablemente sí podrían ser identificados mediante esta técnica (Fraser *et al.*, 1982b).

Las principales características descritas para cada uno de los serotipos de *M. haemolytica* se describen en la tabla 4.

I.4.3. Identificación Molecular de las *Pasteurellaceae*

La identificación fenotípica de los aislados de *M. haemolytica* (Angen *et al.*, 2002) y *P. multocida* (Hunt *et al.*, 2000) parece no ser suficiente para llegar a una identificación definitiva y confiable de estos microorganismos. Las condiciones del aislamiento pueden influenciar la expresión de la morfología bacteriana, los patrones de fermentación de azúcares y las propiedades serológicas.

Las técnicas moleculares podrían ayudar a una mejor caracterización de los aislados y aumentar la confiabilidad de los resultados. En un estudio epidemiológico es muy importante la precisión en la identificación de los aislados particularmente de las cepas más virulentas (Hunt *et al.*, 2000).

La clasificación taxonómica actual de las *Pasteurellaceae* se basa en la secuenciación del 16S ARN ribosomal, sin embargo esta metodología no es aplicable en el diagnóstico de rutina. Por ello, las alternativas más aplicadas en estos casos son la identificación por PCR (Townsend *et al.*, 1998; Hunt Gerardo *et al.*, 2001; Catry *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2010; Alexander *et al.*, 2008; Guenter *et al.*, 2008; Deressa *et al.*, 2010).

I.5. FACTORES DE VIRULENCIA EN LAS CEPAS DE *MANNHEIMIA* Y *PASTEURELLA* ASOCIADOS A LA PASTEURELOSIS NEUMÓNICA OVINA

Los mecanismos de patogenicidad de las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* son variables, y se expresan dependiendo de la cepa aislada y del estatus inmunitario del hospedador al que infectan (Highlander, 2001).

Tabla 4: Principales características de los serotipos de *M. haemolytica**

Serotipo	Hospedador Común	Tipo electroforético (a)	Linaje (a)	Ribotipo (b)	Composición de la cápsula (c)	Tipo de núcleo LPS (d)	Tipo Ag-O (e)	Tipo de OMP (f)	Alelo de Lkt (g)
A1	Bovino Ovino	1**, 2, 6, 7, 8	A	HA**, HB, HC, HD	→ 3)-ManNAc-(beta → 4)-ManNAcA-(beta1 →	1**, 2, 3	→ 3)-beta-D-Gal-p-(1 → 3)-beta-D-GalpNAc-(1 → 4)-beta-D-Gal-p-(1 →	1.1, 1.2	1.1, 1.5
A2	Ovino Bovino	16, 17, 18, 19 20, 21**, 22	C, A	HA**, HB, HC**, HE, HF, HG	→ NAN-(alpha → 8)NAN (acido siálico) →	1, 3	Ninguno	2.1, 2.2 **	2, 2.1, 2.2, 3, 8, 8.1, 8.2, 10, 10.1
A5	Ovino	5	A	HA, HI	Similar a A1?	1	Similar a A1	1.2	1.2
A6	Bovino Ovino	1, 9	A	HA**, HD	Similar a A1?	1**, 2	Idéntico a A1	1.1, 1.2	1.1, 1.2, 1.5
A7	Ovino	4, 12**, 13, 14	A, B	HA, HC**	→ 3)-betaGalNAc-(1 → 3)-alphaGlcNAc-(1-p →	1, 3, 4**	Similar a A1	1.2, 2.1, 2.2, 3.1	1.3, 8.1
A8	Ovino	5	A	HA, HD, HJ	Similar a A1?	1	Ninguno	1.2	1.4
A9	Ovino	3	A	HA**, HD, HK	Similar a A1?	1**, 3	Idéntico a A1	1.2	1.2, 1.4
A12	Ovino	1	A	HA, HM	Similar a A1?	1	Idéntico a A1	1.2	1.2
A13	Ovino	ND	B	HN	Similar a A7?	4	Similar a A1	3.3	6
A14	Ovino	ND	A	ND	Similar a A1?	1	Similar a A1	2.3	9
A16	Ovino	ND	A	HA	Similar a A1?	1	Similar a A1	2.3	7
A17	Ovino	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND

* Tabla modificada (Highlander, 2001). **Grupo predominante (con significancia estadística) en la clase o el tipo. ND: no determinado. Gal: galactosa. GalNAc: N-acetilgalactosamina. ManNAcA: N-acetilmanosamina. NAN: N-acetilneuramina. (a) (Davies et al., 1997). (b) (Kodjo et al., 1999). (c) (Adlam et al., 1984; Adlam et al., 1987; Davies et al., 1997). (d) (Davies y Donachie, 1996). (e) (Lacroix et al., 1993). (f) (Davies et al., 1996; Davies y Lee, 2004). (g) (Davies et al., 2001). (h) (Lee y Davies, 2011).

1.5.1. *Mannheimia haemolytica*

Los factores de virulencia asociados a los mecanismos de patogenicidad de *M. haemolytica* no han sido completamente definidos hasta la actualidad. Algunos autores sugieren que su presencia difiere entre los aislados obtenidos de pulmones neumónicos versus aislados procedentes de animales sanos (Highlander *et al.*, 2000; Highlander, 2001; Lo, 2001). El factor de virulencia identificado como el más importante para *M. haemolytica*, es una toxina formadora de poro, llamada leucotoxina (Lkt), esta proteína tiene actividad específica contra los leucocitos de rumiantes. Otros factores de virulencia que pueden tener influencia en la patogenicidad de la bacteria pueden ser: el lipopolisacárido (LPS), las proteínas de membrana externa (PME), lipoproteínas (Lpp), proteínas externas de membrana reguladas por hierro (IROMP's del inglés "*iron-regulated outer membrane proteins*"), adhesinas, fimbrias y enzimas (sialoglicoproteasas, neuraminidasa, proteasas, etc.), antígenos aglutinantes serotipo-específicos, además de la cápsula y los genes de resistencia a antibióticos asociados a plásmidos (Burrows, L. L. *et al.*, 1993; Lo, 2001). A diferencia de la leucotoxina, poco se sabe sobre la expresión de los otros factores de virulencia (Tabla 5) (Highlander, 2001).

Todos los genes asociados a los factores de virulencia identificados han sido encontrados en el genoma de *M. haemolytica* A1, el cual ha sido secuenciado recientemente (Gioia *et al.*, 2006). Un reciente estudio secuenció el genoma completo del serotipo A2 de *M. haemolytica* aislado de ovinos y bovinos, evidenciando que el serotipo A2 de ovino tiene 173 genes únicos mientras que el A2 bovino solo 57. Además se encontró una gran proporción de fagos y pseudogenes indicando la presencia de islas de patogenicidad difundidas entre cepas por transferencia horizontal de genes (Lawrence *et al.*, 2010).

El rol en la virulencia de los factores mencionados, aun no ha sido esclarecido, debido a la falta de un modelo animal donde pueda emularse la infección provocada por *M. haemolytica* en los rumiantes (Davies *et al.*, 2001; Highlander, 2001).

Tabla 5: Principales factores de virulencia de *M. haemolytica*

Factor de virulencia	Actividad y rol en la patogénesis	Referencia
Leucotoxina	Citolisina formadora de poro que destruye leucocitos de rumiantes.	(Shewen y Wilkie, 1982)
O-sialoglicoproteasa	Ruptura de las glicoproteínas que conforman la membrana celular de macrófagos y otros leucocitos.	(Abdullah <i>et al.</i> , 1992)
Neuraminidasa	Remueve el ácido siálico de las glicoproteínas de la célula hospedera.	(Frank y Tabatabai, 1981; Straus <i>et al.</i> , 1993a)
Proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMP's)	Adquisición de hierro para el metabolismo bacteriano.	(Ogunnariwo y Schryvers, 1990)
Lipopolisacárido	Actividad endotóxica, y actúa modulando los leucocitos.	(Paulsen <i>et al.</i> , 1990; Whiteley <i>et al.</i> , 1992)
Polisacárido capsular	Enmascaramiento de la superficie bacteriana. Previene la fagocitosis. Resistencia a la lisis mediada por el complemento.	(Brogden <i>et al.</i> , 1989; Czuprynski <i>et al.</i> , 1989; Chae <i>et al.</i> , 1990)
Fimbria/adhesina	Adherencia y colonización	(Morck <i>et al.</i> , 1987; Gonzalez <i>et al.</i> , 1991; Gonzalez <i>et al.</i> , 1995)
Superóxido dismutasa	Supervivencia de la bacteria al estallido oxidativo.	(Lainson <i>et al.</i> , 1996)

1.5.1.1. Cápsula

Los antígenos capsulares son la base de la serotipificación de aislados de *M. haemolytica*. Cada serotipo de *M. haemolytica* produce un polisacárido capsular distinto, aunque la descripción de los componentes de cada uno de los 17 serotipos aún no está completa. Actualmente se conoce la estructura capsular de los serotipos A1, A2, A7, T4 y T15 (Adlam *et al.*, 1984; Adlam *et al.*, 1985a; Adlam *et al.*, 1985b, 1986; Adlam *et al.*, 1987).

La cápsula del *M. haemolytica* A1, está compuesta de repeticiones de disacáridos de ácido N-acetilmanosaminurónico (ManNAcA) unido a β -1,4 N-acetilmanosamina (ManNAc) (Adlam *et al.*, 1984). Los genes *nmaA* y *nmaB* que codifican una epimerasa UDP-GlcNAc-2 y UDP-ManAC-dehidrogenasa, están relacionados con la biosíntesis del polisacárido capsular en *M. haemolytica* A1 (McKerral y Lo, 2002). En el serotipo A2 la cápsula está compuesta por ácido siálico o colomínico, muy parecida a la estructura capsular de *Escherichia coli* K1 (Adlam *et al.*, 1987).

Como en la mayoría de bacterias gram negativas, la cápsula interviene en los mecanismos de adherencia de la bacteria a la célula blanco, en la resistencia al sistema inmunitario del hospedador al enmascarar a la bacteria impidiendo su reconocimiento (Lo *et al.*, 2001), además de proteger a la bacteria de la desecación en medios poco favorables (Moxon y Kroll, 1990). Adicionalmente, los componentes capsulares interactúan con la sustancia surfactante en el pulmón, facilitando la adherencia de la bacteria al epitelio del tracto respiratorio de animales susceptibles (Brogden *et al.*, 1989; Whiteley *et al.*, 1990; Highlander, 2001).

El ácido siálico al ser un componente normal de las membranas celulares, resulta escaso o no inmunógeno cuando forma parte de la composición de la cápsula como sucede en el serotipo A2 (Adlam *et al.*, 1987). En el serotipo A1, se ha probado que la cápsula interviene en la resistencia de la bacteria a la fagocitosis y los anticuerpos anticapsulares opsonizan la bacteria para la captación de macrófagos. Sin embargo, la cápsula del serotipo A1 no estimula la producción de anticuerpos protectores (Confer *et al.*, 1989; Conlon y Shewen, 1993).

Algunas cepas acapsuladas se han aislado de muestras de animales. Se ha descrito que los aislados acapsulares, o cepas mutantes sin cápsula, pueden ser fagocitados más fácilmente que las cepas capsuladas (Lo *et al.*, 2001; McKerral y Lo, 2002).

1.5.1.2. Lipopolisacárido (LPS)

El lipopolisacárido es una endotoxina propia de las bacterias gram negativas, que tiene la propiedad de activar macrófagos, inducir citoquinas, activar la cascada de la coagulación, la agregación plaquetaria y el shock endotóxico (Paulsen *et al.*, 1989; Zecchinon *et al.*, 2005). Constituye el mayor antígeno de superficie y los serotipos somáticos están constituidos de acuerdo a sus componentes antigénicos estructurales. Existe evidencia de que esta endotoxina tiene un efecto directo tóxico sobre las células endoteliales y es capaz de alterar las funciones de los leucocitos causando lisis de las plaquetas (Breider *et al.*, 1990).

El LPS induce la producción de IL-1 β , IL-8 vía TNF- α , iniciando la infiltración de neutrófilos, la inflamación y los daños en las células endoteliales pulmonares (Yoo *et al.*, 1995a; Lafleur *et al.*, 1998). Junto a la leucotoxina forma una molécula de alto peso molecular (Li y Clinkenbeard, 1999) y se cree que muchos de los efectos biológicos de la leucotoxina se deben a la formación del complejo con el LPS (Czuprynski y Welch, 1995; Stevens y Czuprynski, 1995). LPS aumenta la actividad citolítica de la leucotoxina (Lafleur *et al.*, 2001), además puede estabilizar térmicamente a la leucotoxina aumentando su actividad contra células de linfoma bovino (Li y Clinkenbeard, 1999). Una similar asociación se ha observado entre la hemolisina de *E. coli* y el LPS (Walmrath *et al.*, 1994).

Se han reportado ocho tipos diferentes de LPS en el serotipo A1 de *M. haemolytica*, que representan variantes que contienen cuatro combinaciones del oligosacárido central y un antígeno-O con repeticiones idénticas de trisacáridos. El antígeno-O de los serotipos A6, A9 y A12 es químicamente idéntico al del serotipo A1. Aunque la estructura del antígeno-O de los serotipos A5, A7, A13, A14 y T15 aun no se ha descrito, pero todos reaccionan con los antisueros de los serotipos A9 y A12, sugiriendo esto que puedan ser idénticos (Lacroix *et al.*, 1993). A diferencia de los demás, los serotipos A2 y A8 han perdido el antígeno-O y se observan como LPS rugosos, todos los demás serotipos poseen LPS lisos (Ali *et al.*, 1992; Lacroix *et al.*, 1993).

Se han descrito dos genes potencialmente involucrados en la biosíntesis del LPS: *lic2* codifica un péptido de 263 aminoácidos, ubicado inmediatamente después, hacia el extremo 3', del gen que codifica la glicoproteasa, otro potencial factor de virulencia de *M. haemolytica*. El gen de LPS denominado *lpsA*, es una potencial glicosiltransferasa implicada en la biosíntesis del oligosacárido central (Potter y Lo, 1995).

1.5.1.3. Leucotoxina (Lkt)

La leucotoxina de *M. haemolytica*, es una citolisina termolábil calcio-dependiente de 102 kD (*lktA*), que forma parte de la familia de exotoxinas producidas por bacterias gram negativas llamadas toxinas RTX (del inglés “*repeats in toxin*”) (Welch *et al.*,

1992), y es secretada durante la fase logarítmica del crecimiento de la bacteria (Markham y Wilkie, 1980; Shewen y Wilkie, 1985; Zecchinon *et al.*, 2005). Al igual que otras toxinas RTX, como la hemolisina de *E. coli* (*hlyCABD*), está codificada por un grupo (“cluster”) de cuatro genes reunidos en un operón (*lktCABD*) que incluye: un gen estructural de 953 aminoácidos (*lktA*), y genes necesarios para la acilación post-transcripcional (activación de la leucotoxina) (*lktC*) y el sistema de secreción tipo II de la toxina necesaria para su transporte y secreción (*lktB* y *lktD*) (Lo *et al.*, 1985; Lo *et al.*, 1987; Highlander *et al.*, 1989; Strathdee y Lo, 1989a).

Las células más susceptibles a los efectos de la leucotoxina son los macrófagos de bovinos, los neutrófilos de la mayoría de especies de rumiantes, los linfocitos y cultivos celulares de linfoma (Clinkenbeard *et al.*, 1989a; Clinkenbeard *et al.*, 1989c; Majury y Shewen, 1991). Se ha identificado la molécula CD18 como el receptor que interviene en la adherencia de la leucotoxina a los leucocitos de los rumiantes (Al-Haddawi *et al.*, 1999).

La proteína LktA contiene dominios que están involucrados en la formación de poros en la célula a la que se unen. Esta unión, así como su actividad y secreción son dependientes de calcio (Clinkenbeard *et al.*, 1989b; Cruz *et al.*, 1990; Forestier y Welch, 1991). La secuencia aminoterminal contiene hélices hidrofóbicas que se extienden sobre la célula hospedera y provocan la formación de poros (Forestier y Welch, 1991). Aun no está claro si la unión de la bacteria a la célula blanco es una interacción no-específica o interacciona específicamente con receptores β 2-integrinas. El dominio carboxiterminal de la proteína contiene series de repeticiones ricas en glicina y aspartato y, al igual que en otras toxinas RTX, han demostrado unirse al calcio y potenciar su actividad tóxica (Rowe *et al.*, 1994). Se ha probado que LktA es especie específico, y tiene actividad citotóxica y hemolítica solo contra células linfoides de rumiantes (Kaehler *et al.*, 1980; Shewen y Wilkie, 1982; Murphy *et al.*, 1995).

Los genes codificante de la leucotoxina han sido identificados en todos los serotipos de *M. haemolytica* (incluyendo *B. trehalosi* y especies del genero *Mannheimia*) (Burrows, L. L. *et al.*, 1993) y casi todos los serotipos secretan la proteína (Burrows, L. L. *et al.*, 1993; Saadati *et al.*, 1997). Davies *et al.*, (2001) realizó un estudio sobre la evolución

molecular del gen *lktA* en cepas de *M. haemolytica*, *B. trehalosi* y *M. glucosida*, revelando la existencia de ocho variantes alélicas de la proteína en *M. haemolytica*, y una variante en *B. trehalosi* y *M. glucosida*. Las variantes encontradas representan una variación de cuatro alelos (*lktA1*, *lktA2*, *lktA4*, y *lktA5*) que se cree surgieron a través de recombinaciones intragénicas entre las tres especies bacterianas.

En *B. trehalosi* y *M. glucosida* solo se encuentran los alelos *lktA4* y *lktA5*, respectivamente; mientras que en cepas de *M. haemolytica* aisladas de ovinos, pueden encontrarse genes que llevan en sus secuencias bloques significativos de *lktA4* y *lktA5*. Aparentemente, existe una transferencia horizontal de genes enteros. Este intercambio genético resulta sorprendente puesto que las tres bacterias involucradas ocupan nichos diferentes y causan diferentes enfermedades. Por ejemplo, el alelo *lktA2* es casi exclusivo de bovinos, mientras que otros alelos que llevan porciones de *lktA2* son más comunes en cepas de ovinos. Esto demuestra, que la secuencia de la leucotoxina parece ser mas conservada en cepas de bovinos, mientras que cepas de ovinos exhiben un amplio rango de diversidad (Davies *et al.*, 2001; Highlander, 2001).

La expresión y secreción de la leucotoxina está regulada por varios mecanismos y depende de varios factores. Gentry *et al.* 1986, demostraron que la transferrina y lactoferrina aumenta la producción de la toxina (Gentry *et al.*, 1986). La transcripción de la leucotoxina es máxima durante el crecimiento a 37° C y aumenta en presencia de hierro y a un pH 7,3 (Strathdee y Lo, 1989b). Otros investigadores han reportado que la transcripción de la leucotoxina está regulada por la temperatura pero que la presencia de hierro en el medio reprime la transcripción de la proteína (Marciel y Highlander, 2001).

La leucotoxina tiene la capacidad de unirse a las células de un gran variedad de especies (Sun *et al.*, 1999b). Sin embargo, su capacidad de producir citólisis requiere una interacción específica con el antígeno funcional asociado a linfocitos (LFA-1, del inglés "*lymphocyte function associated antigen 1*") o $\beta 2$ -integrinas en la célula blanco (Al-Haddawi *et al.*, 1999; Jeyaseelan *et al.*, 2000).

En altas concentraciones, la toxina produce poros en la membrana celular provocando su hinchazón y posterior lisis debido al movimiento de potasio, sodio y calcio a través

de los gradientes de membrana (Clinkenbeard *et al.*, 1989b; Clinkenbeard y Upton, 1991). A bajas concentraciones, la toxina produce activación de neutrófilos (Czuprynski *et al.*, 1991), estimula la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-8, leucotrienos y factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés “*Tumour Necrosis Factor*”) (Yoo *et al.*, 1995b), y provoca cambios en el citoesqueleto celular y apoptosis (Stevens y Czuprynski, 1996; Sun *et al.*, 1999a).

La producción de citoquinas en el tejido pulmonar puede llevar a la liberación de H₂O₂, el cual es convertido en radicales hidroxilo por las células endoteliales alveolares, provocando un daño considerable en el tejido y necrosis del epitelio alveolar, resultando en la acumulación de fluido y fibrina en la luz de los alvéolos y los espacios interalveolares (Biberstein y Hirsh, 1999; Lopez, 2001). Todas estas actividades se presentan en el curso de la infección, alterando los mecanismos de la respuesta inmune primaria del tejido pulmonar, participando en la inflamación y destrucción del tejido y estableciendo el cuadro infeccioso (Highlander, 2001).

I.5.1.4. Adhesinas y fimbrias

Las adhesinas tienen la función de unirse a la molécula receptora en la superficie de la célula hospedera durante el proceso de colonización (Gioia *et al.*, 2006). Poco se sabe sobre cuáles son las moléculas que permiten a *M. haemolytica* colonizar el epitelio respiratorio y las criptas tonsilares. Al parecer *M. haemolytica* posee una adhesina que le permite adherirse a la superficie del epitelio respiratorio, el locus que codifica tal adhesina aun no ha sido identificado, aunque se han observado fimbrias en la superficie de la bacteria que podrían intervenir en el proceso de adherencia (Potter *et al.*, 1988; Highlander, 2001).

Se ha determinado que la proteína FbpA interactúa con las proteínas TbpA y TbpB para extraer hierro libre de la glicoproteína transferrina (Ogunnariwo *et al.*, 1997; Kirby *et al.*, 1998). Esto es compatible con un rol multifuncional de recolector de hierro y de adhesina. Sin embargo, FbpA y la adhesina difieren en tamaño, tal vez la adhesina

pueda ser un dímero de FbpA, aunque aún no está claro si ambas están relacionadas en estructura y función (Highlander, 2001).

Una proteína llamada Ssa1 antígeno especie-específico serotipo A1 (del inglés “*serotype A1 specific antigen*”) se ha demostrado que está implicada en la colonización de la nasofaringe por la bacteria. Los estudios demuestran que la inmunización de los animales con anticuerpos contra Ssa1 puede inhibir la colonización del tracto nasal por *M. haemolytica* aunque el rol de la proteína Ssa1 en la colonización del epitelio respiratorio aun no ha sido esclarecido (Frank, 1985; Gonzalez y Maheswaran, 1993). Solo se ha demostrado la expresión de Ssa1 en el serotipo A1. Aunque la secuencia del gen *ssa1* ha dado reacciones cruzadas con los serotipos A2, A5, A6, A7, A9 y A12 aun no se ha esclarecido si es capaz de expresarse en estos serotipos (Gonzalez-Rayos *et al.*, 1986; Gonzalez *et al.*, 1991; Gonzalez *et al.*, 1995). En México, un estudio realizado por Jaramillo *et al.*, (2000), logró purificar por afinidad una adhesina de 68 KDa que aglutinó específicamente eritrocitos de conejo (Jaramillo *et al.*, 2000).

Muchas adhesinas bacterianas son pilis. Se ha descrito el pili tipo IV (*pilABCD*) en aislados de *M. haemolytica* (Morck *et al.*, 1989). Se conoce que el pili tipo IV tiene como función la adhesión y la movilidad en otras bacterias gram negativas y tal vez podría tener las mismas funciones en *M. haemolytica*.

Dos tipos de fimbrias se han encontrado en el serotipo A1 de *M. haemolytica*, una larga y rígida de 12 nm de ancho de 35 KDa y altamente inmunógena, y una pequeña y flexible de 5nm de ancho (Morck *et al.*, 1987; Potter *et al.*, 1988; Morck *et al.*, 1989), aunque su presencia en aislados de *M. haemolytica* no parece ser universal. Los dos tipos de fimbrias son capaces de aumentar la capacidad de adherencia de la bacteria a la mucosa del tracto respiratorio de bovinos y ovinos, posibilitando su colonización (Gonzalez y Maheswaran, 1993).

I.5.1.5. Proteínas de membrana externa (OMP's del inglés: "outer membrane proteins")

En *M. haemolytica*, las proteínas de membrana externa tienen un rol importante en la inmunidad al constituir algunos de los más importantes antígenos para la estimulación de la respuesta inmune, lo que las convierte en potenciales candidatos a ser tomados en cuenta para la vacunación. La capacidad inmunógena varía entre los serotipos de *M. haemolytica*, no produciendo protección cruzada entre serotipos. Esto se comprobó en un estudio desafiando ovejas con los serotipos A2, A7 y A9 e inmunizadas con extractos de OMP's de los mismos serotipos; solo la vacuna con OMP del serotipo A7 produjo una efectiva protección contra la infección homóloga y heteróloga por los serotipos A2, A7 y A9 (Sabri *et al.*, 2000).

El tipo de OMP varía entre los serotipos. La principal proteína de membrana externa pesa 38 KDa y es una proteína PomA sensible al calor, homóloga a la porina OmpA de *H. ducrey* y *E. coli* (Zeng *et al.*, 1999). Se cree que PomA pueda estar involucrada en el transporte de nutrientes a la bacteria y puede ser crítica para mantener la membrana externa bacteriana.

Otras proteínas de membrana externa presentes son las lipoproteínas. En *M. haemolytica* son cinco las lipoproteínas descritas, con pesos moleculares en un rango de 19 a 45 KDa (Murphy y Whitworth, 1993; Dabo *et al.*, 1994; Pandher y Murphy, 1996; Pandher *et al.*, 1998; Pandher *et al.*, 1999). Se construyó una cepa mutante de *M. haemolytica*, deleccionando los genes de las lipoproteínas PlpA, PlpB y PlpD. Esta cepa fue más sensible a la lisis mediada por el complemento y a la respuesta inmune dependiente de anticuerpos, además creció más lentamente que la cepa silvestre (Murphy *et al.*, 1998).

Además de su función en la resistencia al sistema inmune del hospedador, las lipoproteínas han mostrado tener otras actividades en la patogénesis. Una preparación de OMP's de *M. haemolytica* purificada aumenta la adherencia de los neutrófilos y la quimiotaxis *in vitro* y provoca la liberación de interferón gamma (IFN- α) dependiente de óxido nítrico por macrófagos alveolares, favoreciendo de esta manera la acumulación de neutrófilos en el foco inflamatorio (Iovane *et al.*, 1998).

Una OMP de 35 KDa presente en *M. haemolytica* interviene en la polimerización de los filamentos de actina en la membrana de la célula hospedera. Esta función también ha sido observada en una OMP de 38 KDa presente en *P. multocida*, lo que sugiere que al igual que en otros patógenos las OMP's de *M. haemolytica* están envueltas en la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera (Marcatili *et al.*, 2000).

I.5.1.6. Proteínas externas de membrana reguladas por hierro (IROMP's del inglés: "iron regulated outer membrane proteins")

M. haemolytica produce numerosas proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMP's), que incluyen una proteína de 77 KDa de función desconocida, y dos proteínas de unión a transferrina TbpA y TbpB (Tbp del inglés: "transferrin binding protein") (Deneer y Potter, 1989; Ogunnariwo *et al.*, 1997). *M. haemolytica* no produce sideróforos (Ogunnariwo y Schryvers, 1990) por lo que las proteínas TbpB y TbpA tienen un rol importante en la adquisición de hierro. El análisis de su secuencia sugieren que el operon de ambas proteínas puede ser reprimido por una proteína reguladora similar al regulador de captación de hierro Fur (del inglés: "ferric uptake regulator") (Ogunnariwo *et al.*, 1997). Otras proteínas externas de membrana reguladas por hierro identificadas en *M. haemolytica* son: la FbpA (del inglés "iron binding protein") de 35 KDa (Ogunnariwo *et al.*, 1997), una proteína de unión manganeso putativa (YfeA) (Tabatabai y Frank, 1997) y la leucotoxina (Marciel y Highlander, 2001).

I.5.1.6. Glicoproteasas

Todos los serotipos de *M. haemolytica* producen zinc-metaloproteasas que tienen actividad contra las O-sialoglicoproteínas (Otulakowski *et al.*, 1983; Abdullah *et al.*, 1990). La principal metaloproteasa caracterizada en *M. haemolytica* es la sialoglicoproteína (Gcp) que está codificada por el gen *gcp*, el cual ha sido clonado en una cepa de *E. coli* y secuenciado (Abdullah *et al.*, 1991), sin embargo, no se logró su purificación por encontrarse en estado inactivo (Watt *et al.*, 1997). Esta

sialoglicoproteína tiene actividad endopeptidasa y neuraminidasa siendo capaz de fraccionar la glicoproteína A tipo mucina en diferentes sitios (Abdullah *et al.*, 1992; Jaramillo *et al.*, 2000).

Las proteasas actúan en la superficie de la célula hospedera facilitando la adhesión de la bacteria. Su actividad *in vitro* puede estar potenciada por su incubación con extracto de leucotoxina. Además estimula la agregación de las plaquetas que se depositan en la luz de los alveolos pulmonares (Nyarko *et al.*, 1998). Se ha comprobado que el suero de bovinos convalecientes presentan actividad frente a Gcp, lo cual sugiere que tiene propiedades inmunogénicas en los animales (Boyce, J. R. *et al.*, 2004). Aun se desconoce cuál puede ser la célula blanco de la glicoproteasa, pero probablemente las sialoglicoproteínas presentes en las células de la mucosa respiratoria, los macrófagos alveolares, neutrófilos y otros leucocitos puedan verse afectados por la acción de esta enzima (Boyce, J. R. *et al.*, 2004).

I.5.1.7. Neuraminidasa

La neuraminidasa es una enzima producida por todos los serotipos de *M. haemolytica*, excepto el serotipo A11 (actualmente clasificado como *M. glucosida*). Juega un rol importante en la colonización por la bacteria del epitelio respiratorio (Frank y Tabatabai, 1981; Straus *et al.*, 1993b). Esta enzima produce, primero, una hendidura en la molécula de lactosa N-acetilneuramina, y después en las moléculas de fetuina, ácido 1- α glicoproteína y ácido colomínico (Straus *et al.*, 1993b).

Se ha demostrado que la actividad protectora de la secreción salivar se reduce cuando se remueven los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas salivares. Esto sugiere que la neuraminidasa puede ejercer un efecto patogénico mediante la remoción de residuos de ácido siálico en las glicoproteínas de la célula que componen la mucosa del tejido respiratorio del hospedador, y de esta manera reducir el efecto protector del moco, incrementando la adherencia de *M. haemolytica* a la mucosa del tracto respiratorio superior (Confer *et al.*, 1986; Jaramillo *et al.*, 1999; Highlander, 2001).

En bovinos la secreción de neuraminidasa parece ser más abundante en cepas del serotipo A1, en relación a cepas del serotipo A2, evidenciando que en bovinos la enzima puede estar involucrada en la invasión de *M. haemolytica* durante el establecimiento del proceso infeccioso (Frank y Tabatabai, 1981; Straus *et al.*, 1993b; Lee *et al.*, 1994b).

El genoma de *M. haemolytica* incluye un fragmento de lectura truncada de 550 codones, con una alta homología a un fragmento de 832 codones del gen *nanH* que codifica la neuraminidasa de *P. multocida* (Lee *et al.*, 1994a; Mizan *et al.*, 2000; May *et al.*, 2001).

I.5.1.8. Superóxidodismutasas

Las superóxidodismutasas son metaloenzimas que catalizan la desintoxicación de radicales libres de oxígeno para formar peróxido de hidrogeno y oxígeno molecular. Cuando los neutrófilos son dañados por el efecto de la leucotoxina de *M. haemolytica* se produce el estallido oxidativo y la producción de radicales superóxidos (Czuprynski y Welch, 1995). Los radicales superóxidos promueven la formación de radicales hidroxilo tóxicos, que pueden despolimerizar los polisacáridos, causando lesiones en el ADN, inactivar enzimas y destruir membranas. Aunque estas actividades pueden provocar un extenso daño al tejido pulmonar del hospedador, también va en detrimento de la bacteria. Se ha reportado que los serotipos A2 y A7 de *M. haemolytica* producen una superóxidodismutasa periplásmica, la cual dismuta exógenamente los radicales superóxidos generados, lo que ayudaría a la sobrevivencia bacteriana del estallido respiratorio de los neutrófilos del hospedador durante la infección activa (Lainson *et al.*, 1996).

I.5.2. *Pasteurella multocida*

La información sobre los factores de virulencia asociados a las lesiones neumónicas ocasionadas por *P. multocida* en ovinos es limitado.

I.5.2.1. Factores de adherencia y colonización

Diferentes factores de virulencia intervienen en la adherencia de *P. multocida* a la superficie de las células blancas. Los estudios revelan una preferencia del hospedador en función al serogrupo involucrado y patogenicidad (Jacques *et al.*, 1988; Ackermann *et al.*, 1991; Letellier *et al.*, 1991; Dugal *et al.*, 1992; Isaacson y Trigo, 1995; Al-Haddawi *et al.*, 2000; Borrathybay *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2004a). Los factores de virulencia claves identificados hasta el momento incluyen la cápsula y los lipopolisacáridos (Chung *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2007), además de otros factores como las adhesinas (hemaglutinina filamentosa - *pfhA*, fimbrias tipo IV - *ptfA* y la pilina Flp), toxinas (toxina dermonecrótica: *toxA*), sideróforos (proteínas para la adquisición de hierro: *exbBD-tonB*, *tbpA*, *hgbA* y *hgbB*), sialidasas (aumentan la virulencia de la bacteria al enmascarar sus receptores claves y reducir la efectividad de las defensas del hospedador), neuraminidasas (*nanB* y *nanH*), superóxidodismutasas (*sodA* y *sodC*) genes codificantes de mecanismos de resistencia a antibióticos, y las OMP's (*OmpA*, *OmpH*, *Oma87* y *PlpB*) (Petersen, 1990; Ruffolo y Adler, 1996; Kasten *et al.*, 1997; Ruffolo *et al.*, 1997; Adler *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1999; Fuller *et al.*, 2000; Hunt *et al.*, 2000; Mizan *et al.*, 2000; Kehrenberg *et al.*, 2001b; May *et al.*, 2001; Ogunnariwo y Schryvers, 2001; Cox *et al.*, 2003; Bosch, M. *et al.*, 2004; Ewers *et al.*, 2006).

Dentro de *P. multocida* se han caracterizado distintos sistemas de adquisición de hierro que incluyen las proteínas de unión a transferrina tipo A (Tbp, del inglés: Transferrin binding protein) y proteínas de unión a hemoglobina A y B (Hgb, del inglés: hemoglobin binding protein). La adquisición de hierro a través de las proteínas HgbA y HgbB ha sido caracterizado y ambas son capaces de unirse a hemoglobina (Bosch *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2003).

Aunque no se ha asociado la presencia de ningún factor de virulencia al serotipo capsular, se ha observado que el gen *pfhA* que codifica una hemaglutinina filamentosa es más frecuente en los serotipos A, B, E y F, el gen *tbpA* para la adquisición de hierro se asocia con los serotipos A y B, y que el gen *toxA* que codifica la toxina dermonecrótica se asocia con mayor frecuencia al serotipo D (Ewers *et al.*, 2006).

1.5.2.2. Fimbrias y adhesinas

Los mecanismos de adherencia a las células bovinas durante la enfermedad respiratoria, y los factores relacionados con ella, han sido pobremente esclarecidos y en ovinos la información es aún más escasa (Dabo *et al.*, 2007). El amplio rango de hospedadores de *P. multocida* sugiere un reconocimiento de componentes de la superficie de la célula blanco común entre todas las especies animales y tipos de tejidos. Recientes estudios han demostrado que *P. multocida* puede unirse a las moléculas que componen la matriz extracelular de la célula hospedera, incluyendo la fibronectina (Dabo *et al.*, 2005). Las proteínas de *P. multocida* recientemente identificadas como proteínas putativas de unión a fibronectina incluyen una proteína de membrana externa OmpA, un receptor TonB dependiente, la proteína HgbA (del inglés “hemoglobin-binding protein A”), y la proteína de unión a transferrina TbpA (del inglés “transferrin binding protein A”) (Dabo *et al.*, 2003; Dabo *et al.*, 2005).

Se han reportado fimbrias como factores de adherencia en aislados de *P. multocida* serotipo A (Glorioso *et al.*, 1982; Rebers *et al.*, 1988; Ruffolo *et al.*, 1997). Los serotipos A, B, D y cepas B:2 poseen pili tipo IV denominadas como ptfA aunque su rol no está aún esclarecido (Ruffolo *et al.*, 1997; Doughty *et al.*, 2000; Siju *et al.*, 2007), sin embargo, la comparación de la secuencia de sus genes codificantes revela que existen variaciones entre cada uno de los aislados (Doughty *et al.*, 2000).

Una proteína de membrana externa de 39 KDa, la lipoproteína B, ha mostrado ser un factor involucrado en la adherencia de *P. multocida* serotipo A y de estimular la inmunidad cruzada protectora en ratones y pollos (Borrathybay *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2004b; Tabatabai y Zehr, 2004; Harper *et al.*, 2006).

El genoma de *P. multocida* contiene algunos genes codificantes de adhesinas homólogos a la hemaglutinina filamentosa (pfhaB1 y pfhaB2) de *Bordetella pertussis* y a la fibrilla de superficie (Hsf1 y Hsf2) de *Haemophilus influenzae* (May *et al.*, 2001). Adicionalmente utilizando el método de Mutagénesis dirigida (SMT por sus siglas en inglés “signature-tagged mutagenesis”) se identificaron cuatro genes relacionados con la adherencia en aislados de *P. multocida* de bovinos, que incluyen dos genes *pfhaB1* y *pfhaB2*, un gen *pfhaC* (similar al gen *FhaC* accesorio de la hemolisina de *B. pertussis*) y

un gen *tadD* (homólogo a la proteína *tadD* de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*). Sin embargo, solo el 46% de los aislados obtenidos de bovinos presentaban el gen *fha*, y una asociación significativa se observó entre estatus infeccioso y aislados que poseían el gen *pfhA* (Ewers *et al.*, 2006).

Las neuraminidasas (sialidasas) son prevalentes en aislados de *P. multocida* y se ha demostrado que se expresan “*in vivo*” en bovinos con neumonía (White *et al.*, 1995; Straus *et al.*, 1996; Ewers *et al.*, 2006). Estudios experimentales en ratones evidencian que esta neuraminidasa está asociada con la virulencia (Muller y Krasemann, 1974) y puede contribuir a la adherencia, colonización y persistencia de la bacteria (Mizan *et al.*, 2000), sin embargo, en bovinos esta relación no ha podido ser comprobada (Dabo *et al.*, 2007). Dos genes codificantes de sialidasas, *nanB* y *nanH*, han sido reportados en cepas de *P. multocida* aisladas de bovinos con una frecuencia de 100% y 85% respectivamente (Mizan *et al.*, 2000).

Las diferencias moleculares entre cepas de *P. multocida* comensales y patógenas no ha sido esclarecida hasta el momento, pero se conoce que los mecanismos implican claramente la capacidad de la bacteria para inducir la respuesta inflamatoria a través de los receptores “*toll-like*” (TLR’s). La señalización por TLR’s es crucial para la respuesta inmune innata durante la primera línea de defensa de la célula hospedera contra la infección bacteriana, lo que provoca la activación de la respuesta inmune adaptativa que es la encargada de eliminar a la bacteria. Es por ello, que se ha reportado que las adhesinas bacterianas dependen de los TLR’s para inducir la producción de citoquinas proinflamatorias (Hajishengallis *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2006).

I.6. EPIDEMIOLOGÍA DE LA PASTEURELOSIS NEUMÓNICA

La pasteurelosis neumónica en ovinos, como en la mayoría de las especies rumiantes, es de naturaleza multifactorial, estando asociada a la presentación de varios factores concurrentes que interaccionan para causar enfermedad, así se describen factores

propios del hospedador (inmunológicos, fisiológicos, etc.), agentes infecciosos (virus, bacterias y micoplasmas), factores ambientales y de manejo (Brogden *et al.*, 1998).

Mannheimia haemolytica se considera un comensal del tracto respiratorio superior de una gran proporción de ovejas sanas y es el agente que comúnmente se aísla de los problemas neumónicos en la mayoría de rumiantes, mientras que *P. multocida* solo produce casos esporádicos. *P. multocida* es común en ovejas en zonas tropicales y es menos importante en zonas templadas (Radostitis *et al.*, 2000). *B. trehalosi* se encuentra en las amígdalas de ovejas portadoras y se asocia a pasteurelosis septicémica en corderos mayores (Quinn *et al.*, 2002). Diversos estudios indican que la distribución de las especies de *Mannheimia* y *B. trehalosi* y sus serotipos en rumiantes depende del tipo de muestras analizadas (pulmones neumónicos, hisopos nasales) y del área geográfica (Fodor *et al.*, 1999; Angen *et al.*, 2002; Sisay y Zerihun, 2003).

Los brotes de Pasteurelosis neumónica en las explotaciones ovinas suelen iniciarse con la muerte súbita de algunos animales y alteraciones respiratorias agudas de otros. A menudo se asocian con cambios en el manejo o cambios climáticos, siendo más prevalente a finales de primavera e inicios del verano (Radostitis *et al.*, 2000). El diagnóstico se realiza por los hallazgos anatomopatológicos y el aislamiento del *M. haemolytica* de las lesiones pulmonares (Quinn *et al.*, 2002).

Los corderos de entre 5 y 12 meses y las ovejas que acaban de parir son más susceptibles a la infección (Alley *et al.*, 1999). Los corderos más jóvenes menores a 2 meses son altamente susceptibles y la infección progresa rápidamente a una septicemia fatal (Radostits, *et al.*, 2000).

El serotipado capsular es la base inicial de tipificación epidemiológica de los aislados de *M. haemolytica*. Estudios experimentales iniciales demostraron que los corderos son más susceptibles que las ovejas adultas a infección por el tipo A de *M. haemolytica* (Smith, 1960), desarrollando una infección mucho más severa en la cual la muerte súbita puede ocurrir sin signos clínicos previos.

Una gran variedad de serotipos se han asociado a procesos neumónicos en ovinos. El serotipo A2 se asocia con frecuencia a los procesos neumónicos en el ganado ovino (Gilmour y Gilmour, 1989b), aunque se aíslan una gran variedad de serotipos (A1, A6-

A9, A11 y A12) (Fodor *et al.*, 1999; Angen *et al.*, 2002; Sisay y Zerihun, 2003; Kirkan y Kaya, 2005; Villard *et al.*, 2006). La prevalencia de los serotipos A5, A6 y A7 ha aumentado en los últimos 10 años (Ewers *et al.*, 2004). En bóvidos el serotipo A2, aunque se aísla de la nasofaringe de los animales sanos, raramente se asocia a la enfermedad y es sustituido rápidamente por el serotipo A1 en el tracto respiratorio tras situaciones estresantes (Frank y Smith, 1983; Al-Ghamdi *et al.*, 2000). Además de la multiplicidad de serotipos de *M. haemolytica* asociados a estos procesos, existen variaciones genéticas dentro de un mismo serotipo (Davies *et al.*, 1997; Kodjo *et al.*, 1999).

Los aislados ovinos y bovinos de determinados serotipos (A1, A2 y A6) pueden diferenciarse por los perfiles electroforéticos de sus proteínas externas de membrana (OMP's) y por su genotipo cromosómico indicando que existen distintas subpoblaciones de estos serotipos adaptados a cada especie animal (Davies y Donachie, 1996; Davies *et al.*, 1997). Los resultados de estudios experimentales en corderos indican que determinados serotipos, como el A2, A7 y A9, tienen mayor virulencia que otros y causan procesos neumónicos más graves (Odugbo *et al.*, 2004).

La leucotoxina es un importante factor de virulencia de *M. haemolytica* que está implicado en la inmunidad del hospedador (Zecchinon *et al.*, 2005). La leucotoxina de las estirpes ovinas y bovinas de *M. haemolytica* presenta 10 grupos de variantes alélicas designadas de Ikta1 a Ikta10. De ellas, 5 variantes alélicas están presentes solo en las cepas ovinas. En contraste existe una menor diversidad alélica en las cepas bovinas (Davies *et al.*, 2001).

La leucotoxina de los aislados ovinos del serotipo A2 es una de las que presenta mayor diversidad, se han descrito al menos cuatro variantes alélicas, dos de ellas representativas de cada uno de los dos principales linajes de las estirpes patógenas ovinas del serotipo A2 (Davies *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2002).

Estudios sobre tipos de LPS, OMP's y tipos capsulares (factores que pueden constituir importantes componentes de la virulencia bacteriana) sugieren que *M. haemolytica* tiene una estructura de población clonal. La recombinación cromosómica ocurre relativamente de forma infrecuente en poblaciones naturales de *M. haemolytica* y en

consecuencia la estructura genética de esta especie es básicamente clonal. Esta hipótesis está soportada por el hecho de que se ha observado el mismo genotipo multilocus en un amplio rango de muestras de distintas aéreas geográficas y en diferentes periodos de tiempo (Davies *et al.*, 1997).

Un estudio realizado por Davies *et al.* (1997) describió la existencia de 22 tipos electroforéticos que agrupaban cuatro linajes filogenéticos (linajes 1A, 1B, 2 y 3) entre los aislados de *M. haemolytica* procedentes de bovinos y ovinos (Davies *et al.*, 1997). Además, *M. haemolytica* se subdivide en tres grupos de acuerdo a su tipo de LPS y en otros tres grupos de acuerdo a sus perfiles de OMP (Davies y Donachie, 1996; Davies *et al.*, 1997).

En ovinos se encuentran 19 ET's comparado a los 5 ET's encontrados en bovinos, de los cuales 17 ET's se encuentran solo en ovejas, 3 ET's solo en bovinos y solo 2 ET's en ambos. Este amplio rango de ET's en ovinos, sugiere que esta especie es el hospedador ancestral de *M. haemolytica*, además, el taxón A11 que es el más cercanamente relacionado con *M. haemolytica* está asociado solo con ovinos (Bisgaard y Mutters, 1986; Davies y Donachie, 1996).

Ciertos perfiles de OMP pueden estar involucrados en la virulencia y en la especificidad de la bacteria al hospedador. Lo mismo sucede con el tipo de Lkt y otros factores de virulencia, donde posibles diferencias en su actividad y especificidad deben ser investigados. En ovinos, la alta incidencia del serotipo A2 y de los tipos de LPS 1B y 3B sugieren que estos factores son importantes en la virulencia y especificidad de hospedador en ovinos (Davies *et al.*, 1997). Estas variaciones genéticas pueden ser las responsables de las diferencias observadas en la virulencia y especificidad de hospedador.

Los estudios realizados sugieren que las variaciones genéticas en estos factores de virulencia suponen variaciones antigénicas que confieren una ventaja al patógeno para eludir la respuesta inmune del hospedador (Zecchinon *et al.*, 2005). Esto tiene importantes implicaciones en el diseño de vacunas puesto que la leucotoxina es un importante factor de virulencia que activa la inmunidad de hospedador y es, por ello,

un componente importante de algunas vacunas diseñadas para prevenir la pasteurelosis neumónica.

La identificación y el serotipado de los aislados de *M. haemolytica* es un requisito esencial previo a la producción y aplicación racional de vacunas frente a la pasteurelosis neumónica ovina en áreas geográficas determinadas. A pesar de la nueva clasificación, la identificación correcta de los aislados continua siendo difícil y laboriosa y complica los estudios epidemiológicos y de patogénesis de los procesos neumónicos producidos por *M. haemolytica*, siendo necesaria una caracterización fenotípica y genotípica para la correcta clasificación de los aislados (Angen *et al.*, 2002).

Al igual que ocurre con otros procesos infecciosos, la epidemiología y patogenia de los procesos neumónicos, en los que participa *M. haemolytica* como principal agente etiológico, ha sido ampliamente estudiada en la especie bovina pero existen muchos menos estudios en ovino y prácticamente no se ha estudiado en caprino. En España, no se han realizado estudios epidemiológicos para estudiar la frecuencia relativa de los distintos serotipos en la neumonía ovina.

En *Pasteurella multocida*, los serogrupos se identifican en base a las diferencias en los polisacáridos capsulares (Carter, 1955) y son designados como A, B, C, D, E y F. Además se subdivide en 16 tipos somáticos en base a las diferencias serológicas del lipopolisacárido de la pared celular (Heddleston *et al.*, 1972a). Es frecuentemente asociada a septicemia hemorrágica en vacas y búfalos y a neumonía enzoótica en rumiantes jóvenes. También se ha reportado en humanos como causante de neumonías agudas o crónicas en humanos (Beyt *et al.*, 1979; Marinella, 2004).

1.7. PATOGÉNESIS DE LA PASTEURELOSIS NEUMÓNICA

La patogénesis de la pasteurelosis neumónica permanece sin ser esclarecida, diversos estudios se han realizado en el tema sin obtener hasta el momento resultados consistentes. Debido a la complejidad de la enfermedad, la falta de información y a la

naturaleza de la bacteria, muchos de los datos obtenidos resultan controversiales y especulativos (Mohamed y Abdelsalam, 2008).

Diversos investigadores han indicado que *M. haemolytica* no causa enfermedad por sí sola sin la presencia de factores predisponentes (Yates, 1982; Cutlip *et al.*, 1996). En algunos estudios experimentales la inoculación directa de la bacteria en animales sanos no produjo la enfermedad, ya que fue eliminada rápidamente por los mecanismos de defensa pulmonares (Mohamed y Abdelsalam, 2008). Por otro lado, se han descrito signos clínicos compatibles con pasteurelisis aguda en vacas (Vestweber *et al.*, 1990), ovejas (Foreyt y Silflow, 1996) y cabras (Ngatia *et al.*, 1986) que fueron inoculadas experimentalmente con un cultivo puro de *M. haemolytica* por vía intratraqueal y en los que no se logró determinar ningún factor predisponente.

En la actualidad, el establecimiento de la infección del tracto respiratorio por *M. haemolytica* parece depender de varios factores, interaccionando al mismo tiempo: la presencia de la bacteria en las vías respiratorias, el estatus inmunológico del animal, y la presencia de factores predisponentes en el desarrollo de la infección y el desarrollo de lesiones pulmonares (Mohamed y Abdelsalam, 2008).

La mayoría de infecciones producidas por *M. haemolytica* son principalmente endógenas, causadas por bacterias que residen normalmente en el tracto respiratorio superior, aunque infecciones exógenas también pueden ocurrir por contacto directo con animales enfermos o a través de aerosoles. En cualquiera de los dos casos, la enfermedad es desencadenada por una exposición súbita a condiciones de estrés o por una infección inicial con otros patógenos respiratorios como virus, micoplasmas u otras bacterias.

El estrés y las infecciones virales podrían predisponer a la infección por *M. haemolytica* al dañar los mecanismos inmunes primarios como el movimiento de las células ciliadas, las secreciones mucosas de la tráquea, bronquios y bronquiolos. Las bacterias atraviesan la nasofaringe y llegan al pulmón por gravedad a través de los bronquios ventrales, estableciendo la infección en bronquios, bronquiolos y alveolos (Mohamed y Abdelsalam, 2008).

En las cepas de *M. haemolytica* aisladas de rumiantes se han identificado diversos mecanismos de patogenicidad a través de potentes antígenos, los cuales incluyen: la leucotoxina (Lkt) con actividad específica contra leucocitos de rumiantes, el lipopolisacárido (LPS), las proteínas de membrana externa (OMP's), las proteínas externas de membrana reguladas por hierro (IROMP's), fimbrias, adhesinas, enzimas (neuraminidasa, proteasas, metaloglicoproteasas), antígenos aglutinantes serotipo-específicos, además de la cápsula y los plásmidos y genes de resistencia a antibióticos (Burrows, G. E. *et al.*, 1993; Burrows, L. L. *et al.*, 1993; Fedorova y Highlander, 1997b; Lo, 2001; Marciel y Highlander, 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2002; Jaramillo *et al.*, 2009). Estos factores de virulencia son capaces de promover la adhesión, colonización y proliferación de la bacteria dentro del tejido respiratorio del hospedador, y de participar activamente en la conversión de la bacteria de comensal a patógeno (Confer *et al.*, 1990; Gonzalez y Maheswaran, 1993; Quinn *et al.*, 2002).

La leucotoxina se considera el principal y más significativo factor de virulencia elaborado por *M. haemolytica*. La toxina produce una amplia variedad de efectos biológicos sobre los leucocitos, cuyo resultado final es una pleuroneumonía fibrinosa aguda (Deshpande *et al.*, 2002; Narayanan *et al.*, 2002). El receptor celular para la leucotoxina es el receptor transmembrana CD18, a través de la subunidad beta de la familia de las β_2 -integrasinas. El CD18 forma un complejo con CD11a forma del LFA-1 (del inglés: "*lymphocyte-function-associated antigen 1*"), el cual es responsable de la alta afinidad de adhesión de la leucotoxina a leucocitos y plaquetas de rumiantes (Al-Haddawi *et al.*, 1999; Ambagala *et al.*, 1999; Deshpande *et al.*, 2002; Dassanayake *et al.*, 2007a; Dassanayake *et al.*, 2007b).

El efecto de la leucotoxina es dosis dependiente, a bajas concentraciones, puede provocar el estallido oxidativo de la célula blanco y su degranulación, mientras que a altas concentraciones puede inducir apoptosis (Wang *et al.*, 1998; Cudd *et al.*, 2001; Thumbikat *et al.*, 2005). Altas concentraciones de leucotoxina provocan la necrosis de la célula blanco como consecuencia de la formación de un poro en la membrana plasmática (Clarke *et al.*, 1998), lo que conlleva a la hinchazón de la célula y lisis por el cambio en el flujo de salida del K^+ y del Ca^{2+} . A concentraciones subcitotóxicas, la Lkt

aumenta la respuesta inflamatoria al activar las células para que liberen mediadores, proteasas y metabolitos de oxígeno reactivo. Las lesiones en pulmones infectados incluyen: exudado fibrinoso, trombosis de vasos linfáticos debido al efecto de la toxina en los neutrófilos (Breider *et al.*, 1988) y a la lisis de las plaquetas (Clinkenbeard y Upton, 1991).

Diversos estudios han demostrado que la inoculación intratraqueal de bovinos con cepas mutantes en la leucotoxina producen menos lesiones pulmonares y reducen la mortalidad, en comparación con cepas silvestres (Petras *et al.*, 1995). Resultados similares se obtienen con inoculaciones endobronquiales (Tatum *et al.*, 1998). Sin embargo, en un estudio realizado inoculando cepas mutantes de Lkt por vía intratorácica (DL₅₀), la cepa mutante fue capaz de producir lesiones pulmonares menos extensas, pero fue eficiente en colonizar el tracto respiratorio superior. De estos resultados se pudo deducir que otros factores de virulencia, además de la leucotoxina, son críticos para la patogénesis (Highlander *et al.*, 2000).

La liberación de la leucotoxina y otras enzimas liberadas posteriormente a la citólisis, actúan como factores quimiotácticos, atrayendo más células inflamatorias al sitio de la infección lo que provoca más daño en el tejido pulmonar debido al reclutamiento de células en el área de infección (Zecchinon *et al.*, 2005). La inducción de la secreción y la liberación de péptidos quimiotácticos vasoactivos, aumenta el número de leucocitos disponibles en el lugar de la inflamación, produciéndose depósitos fibrinosos. Cualquier posibilidad de una respuesta inmune secundaria es interrumpida por la actividad de la leucotoxina que previene la blastogénesis de los linfocitos (Narayanan *et al.*, 2002; Jaramillo *et al.*, 2009).

Además, la leucotoxina, junto a la sialoglicoproteasa, induce la activación de plaquetas en los bovinos. Ambas enzimas, podrían interactuar directamente con las plaquetas estimulando la agregación plaquetaria y la formación de fibrina en el tejido alveolar de los pulmones afectados (Nyarko *et al.*, 1998). Entre los leucocitos, los macrófagos son más resistentes que los neutrófilos contra el efecto lítico de la leucotoxina, y entre los macrófagos alveolares son más resistentes los de los bovinos adultos que los de los terneros menores de 16 semanas de edad (Zecchinon *et al.*, 2005).

Todas estas endotoxinas producidas debido al rápido crecimiento y multiplicación de la bacteria en los lóbulos infectados, causan una extensa trombosis intravascular de venas, capilares y vasos linfáticos pulmonares lo que conlleva a la isquemia del tejido y posterior necrosis focal del parénquima pulmonar, acompañada, por una severa infiltración de células inflamatorias y acumulación de exudado fibrinoso (Slocombe *et al.*, 1985; Lopez, 2001). La formación de complejos antígeno-anticuerpo contribuye al aumento de la permeabilidad vascular y a la quimiotaxis de neutrófilos, con la consecuente liberación de lisozima. La severidad de las lesiones dependerá de la proliferación de la bacteria y su extensión y de la cantidad de endotoxinas liberadas, lo cual depende a su vez, de la virulencia de la cepa patógena involucrada y del nivel de defensa del sistema inmune del hospedador (Hilwig *et al.*, 1985).

I.8. LESIONES PULMONARES

Las lesiones neumónicas ocasionadas por la infección de *M. haemolytica* y *P. multocida* se observan como una bronconeumonía fibrinosa y pleuritis que tiende a ser crónica (Friend *et al.*, 1977). Las lesiones se observan principalmente en los lóbulos apicales con disposición cráneoventral, los septos interlobulares se observan distendidos y repletos de un fluido gelatinoso o fibrina producto del edema. Los nódulos mediastínicos se encuentran frecuentemente congestionados y edematosos.

Microscópicamente, los cambios observados se corresponden con una neumonía fibrinosa, con áreas de necrosis coagulativa, y pleuritis fibrinosa, capilares congestionados y rellenos de fibrina, material proteináceo, eritrocitos, macrófagos y neutrófilos. Hay hiperplasia de neumocitos y bronquiolitis fibrinopurulenta (Brogden *et al.*, 1998).

Cabe resaltar que las lesiones producidas por *M. haemolytica* y *P. multocida* son muy similares a nivel histológico. Algunos autores sugieren que la diferencia más evidente es la gran infiltración de neutrófilos en infecciones por *P. multocida* (Ames *et al.*, 1985).

I.9. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO DE LA PASTEURELOSIS OVINA

La utilización de antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas es una práctica de manejo que está ampliamente extendida en la producción animal. Para combatir las pasteurelosis neumónica los antibióticos son utilizados de manera terapéutica y profiláctica (Schwarz *et al.*, 2004). En la terapia con antibióticos, los animales son tratados en base a un diagnóstico inicial de la enfermedad, aunque a menudo el tratamiento no se base en resultados de pruebas de sensibilidad a antibióticos. El tratamiento puede administrarse a todo el lote, con el objetivo de reducir la morbi-mortalidad en animales con infecciones subclínicas cercanos a los animales enfermos o como tratamiento.

En rumiantes, el tratamiento antibiótico es la principal herramienta de prevención y control de infecciones debidas a *Pasteurella* y *Mannheimia*. Sin embargo, el uso imprudente de los antimicrobianos supone un alto riesgo de seleccionar bacterias resistentes, promover la diseminación de genes localizados en plásmidos y transposones, y consecuentemente reducen la eficacia de los antimicrobianos comúnmente disponibles para el tratamiento de infecciones en animales de producción (Kehrenberg *et al.*, 2001b).

Una lista de antibióticos de uso veterinario está recomendada en el tratamiento de infecciones respiratorias en animales de producción. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) regula la lista de antimicrobianos de importancia veterinaria que pueden ser utilizados para tratar estas infecciones (OIE, 2007).

M. haemolytica es el agente más frecuentemente aislado de pulmones con neumonía en rumiantes y es generalmente más resistente a los antibióticos que *P. multocida*. Sin embargo, cepas de *M. haemolytica* aisladas de ovejas y cabras generalmente son menos resistentes a los antibióticos que cepas de *M. haemolytica* aisladas de vacas (Kehrenberg *et al.*, 2001b).

La mayoría de las bacterias de los géneros *Mannheimia* y *Pasteurella* son sensibles a un amplio rango de antibióticos de los principales grupos farmacológicos. A pesar de ser bacterias gram negativas, se ha demostrado que tienen una alta sensibilidad a los betalactámicos (clavámicos y cefalosporinas: cefquinome, ceftiofur). Existen además

otros antibióticos comúnmente utilizados en el tratamiento de la infección por estos agentes, así tenemos: tetraciclinas (oxitetraciclina, doxiciclina y tetraciclina), sulfonamidas potenciadas (trimetoprim + sulfonamidas), macrólidos (tilosina, tilmicosina, tulatromicina), aminoglucósidos (gentamicina), aminociclitolos (espectinomina), lincosamidas (lincomicina), fenicoles (florfenicol) y fluoroquinolonas de segunda generación (marbofloxacin, danofloxacin y enrofloxacin). Una disminución de la sensibilidad y en algunos casos resistencia a antimicrobianos se ha reportado en cepas de *Mannheimia* y *Pasteurella* aisladas de pulmones de rumiantes (Watts *et al.*, 1994; Kehrenberg *et al.*, 2001b).

Actualmente, se han descrito cepas de *M. haemolytica* y *P. multocida* resistentes a la amoxicilina, penicilina, gentamicina, neomicina, tetraciclina, espectinomina, flumequina, florfenicol, tulatromicina, enrofloxacin, tilmicosina y a la combinación sulfametoxazol + trimetoprim, dificultando el tratamiento de animales con signos clínicos de enfermedad respiratoria (Kehrenberg *et al.*, 2001a; Kehrenberg *et al.*, 2001b; Gutierrez *et al.*, 2002; Kehrenberg *et al.*, 2005; Rice *et al.*, 2007; Kehrenberg *et al.*, 2008).

II. HIPÓTESIS

Las estirpes de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* causantes de la Pasteurelisis neumónica ovina presentan perfiles fenotípicos y genotípicos determinados que permiten distinguirlas de las cepas no asociadas a este proceso en corderos.

III. OBJETIVOS

III.1. Generales

Tipificación fenotípica y genotípica de aislados de *M. haemolytica* y *P. multocida* asociados a la presencia de lesiones neumónicas en corderos de cebo sacrificados en matadero.

La tipificación fenotípica se basó en la determinación del serotipo capsular y de los perfiles bioquímicos y la tipificación genética, principalmente, en la detección y caracterización de los genes de los principales factores de virulencia y de sus variaciones.

III.2. Específicos

- ◇ Aislamiento e identificación de bacterias miembros de la familia *Pasteurellaceae* (principalmente *M. haemolytica* y *P. multocida*) en muestras de pulmones de corderos con y sin lesiones neumónicas.
- ◇ Tipificación fenotípica de los aislados, incluyendo la serotipificación (serotipo), la caracterización bioquímica (biotipo) y la sensibilidad a los principales antimicrobianos (antibiotipo) utilizados en el tratamiento de infecciones bacterianas en las explotaciones ovinas.
- ◇ Tipificación genotípica, mediante técnicas moleculares, incluyendo la identificación molecular, y la determinación de la ausencia o presencia de genes que codifican los principales factores de virulencia (toxinas, adhesinas, proteínas de membrana externa y sistemas de adquisición de hierro) de los aislados obtenidos.
- ◇ Establecer asociaciones entre los perfiles fenotípicos y genotípicos de las cepas de *M. haemolytica* y *P. multocida* y la presencia o ausencia de lesiones neumónicas
- ◇ Determinar los patrones de antibiorresistencia de las cepas de *M. haemolytica* y *P. multocida* asociados a las lesiones neumónicas de corderos sacrificados en matadero.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. MUESTREO

IV.1.1. Animales

Se evaluaron un total de 263 pulmones de corderos, obtenidos durante el sacrificio en tres mataderos de la Comunidad de Madrid. Las muestras se recogieron en ocho visitas realizadas a los mataderos en el período comprendido entre Febrero del 2008 y Noviembre del 2009, durante los meses de invierno y primavera. Los corderos provenían de cebaderos de las comunidades autónomas de Extremadura y Madrid.

IV.1.2. Mataderos

Los tres mataderos visitados estaban localizados en tres diferentes municipios de la Comunidad de Madrid. Se visitaron los siguientes mataderos:

- ◇ Cooperativa Cárnica Colmenar – Municipio de Colmenar viejo
- ◇ Matadero Madrid Norte – Localidad de San Agustín de Guadalix
- ◇ Industria Maafasa – Municipio de Getafe

IV.1.3. Criterios de selección de las muestras

La selección de muestras se realizó teniendo como base los siguientes criterios:

- ◇ Animales: las muestras se tomaron de corderos de cebadero, de entre 4 a 5 meses de edad, y entre 20 a 25 Kg. de peso vivo.
- ◇ Tamaño de muestra: Se realizó un muestreo por conveniencia, seleccionando como mínimo 30 pulmones en cada visita. Se intentaron seleccionar al menos 15 pulmones con lesiones neumónicas y 15 sin lesiones.
- ◇ Muestras: se tomaron como muestras los aparatos respiratorios, incluyendo pulmones, tráquea, nódulos linfáticos y corazón. Las muestras de cada animal se embalaron de forma individual en bolsas de plástico de cierre hermético para evitar la contaminación entre los fluidos de las muestras.
- ◇ Criterios de clasificación de los pulmones:
 - a. Pulmones con lesiones neumónicas: Se consideró como muestra de pulmón con lesiones neumónicas los pulmones que macroscópicamente presentaban

lesiones compatibles con bronconeumonía (consolidación pulmonar craneoventral).

- b. Pulmones sin lesiones neumónicas: Se consideró como pulmón sin lesiones neumónicas aquellos pulmones que macroscópicamente no presentaron lesiones aparentes de bronconeumonía (consolidación pulmonar craneoventral).

IV.2. AISLAMIENTO Y ESQUEMA DE SELECCIÓN DE COLONIAS

Los pulmones se sembraron en medios bacteriológicos inmediatamente después de su recogida y traslado al laboratorio (aproximadamente unas cuatro horas después del sacrificio como máximo). Las muestras fueron analizadas siguiendo la técnica de siembra en medios de cultivo, para lo cual, se utilizaron placas de petri de Agar Columbia suplementado con 5% de sangre de cordero (AS Columbia) (bioMerieux, España) (Figura 1) (Biberstein *et al.*, 1958; Carter, 1989; Koneman, 1992).

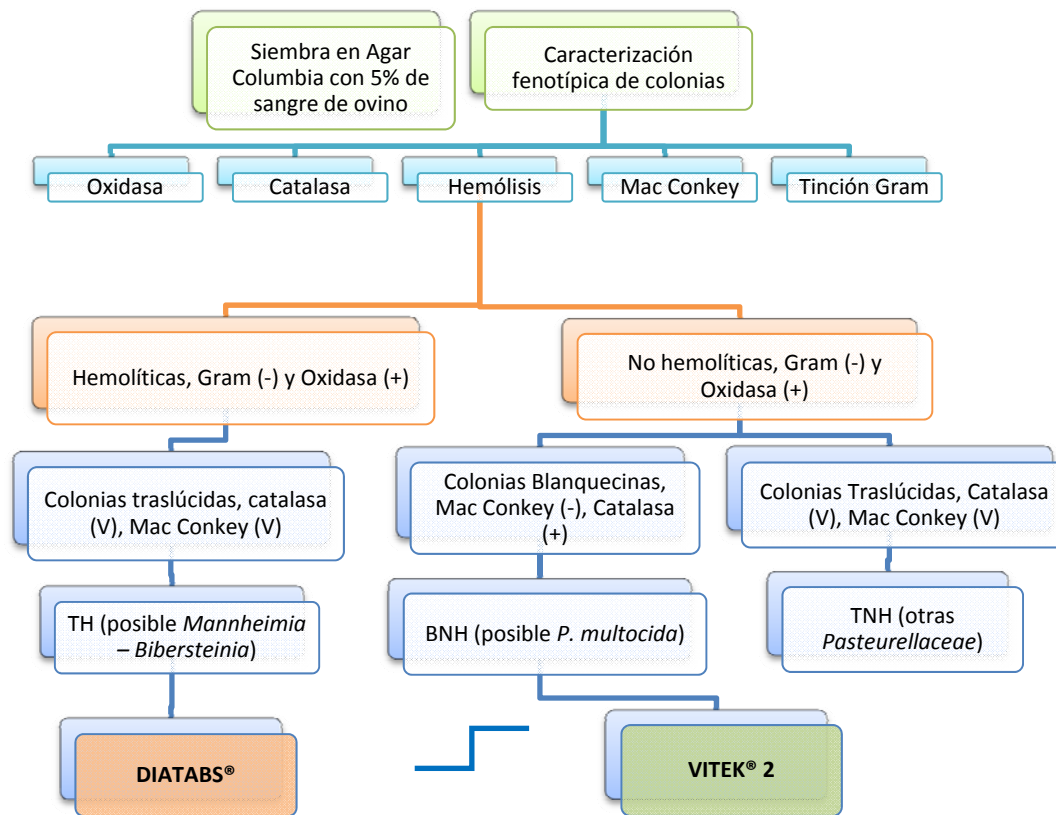
IV.2.1. Procesado de las muestras:

- a. Los aparatos respiratorios se colocaron en una bandeja y se realizó la inspección externa de los órganos, anotándose en una hoja de registro los datos sobre las lesiones macroscópicas observadas en los pulmones.
- b. Para el cultivo del pulmón, se procedió a quemar la superficie (membrana serosa) de la porción de pulmón a analizar con una espátula incandescente.
- c. Se cortó, con una hoja de bisturí estéril, una pequeña muestra de 1 cm x 1cm hacia la parte central del órgano, exponiendo la superficie interna del parénquima pulmonar para realizar la impronta en el medio de cultivo.

IV.2.2. Siembra de las muestras en el medio de cultivo:

- a. Se realizó la impronta directa del pulmón sobre la superficie del medio de cultivo frotándolo y presionándolo ligeramente sobre la superficie.
- b. Con un asa de siembra se agotó la muestra por estrías en el medio de cultivo.
- c. Las placas sembradas se incubaron a 37°C, durante 24 horas.

Figura 1: Esquema de selección de colonias de *Pasteurellaceae*



(V) Variable

IV.2.3. Identificación bioquímica de las colonias sospechosas de ser miembros de la familia *Pasteurellaceae*:

- a. A las 24 horas de incubación se observó la morfología de las colonias, se seleccionaron los tipos de colonias compatibles con los descritos para *Mannheimia* y *Pasteurella* (Figura 1).
- b. Las colonias seleccionadas se sembraron en placas de AS Columbia para aislarlas y obtenerlas en pureza y se incubaron a 37º C durante 24 horas.
- c. A dichas colonias se les aplicó la Tinción Gram y se observó al microscopio con objetivo de 100X y aceite de inmersión para determinar morfología bacteriana.
- d. Se realizaron las pruebas bioquímicas para determinar la presencia de las enzimas catalasa y oxidasa (Oxoid) y se comprobó la presencia o ausencia de hemólisis agar sangre Columbia.
- e. Las bacterias seleccionadas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas diferenciales y sistemas de identificación estandarizados (ver puntos IV.5.1. y IV.5.2. más adelante).

En algunas colonias la hemólisis se distinguió al levantar la colonia. La intensidad de la hemólisis depende del tiempo de incubación, por lo que se observó siempre a partir de las 20 horas de incubación.

IV.3. CEPAS DE REFERENCIA

Se utilizaron cepas de referencia para todos los procedimientos realizados. En la siguiente tabla se describen todas las cepas de referencia utilizadas (Tabla 6). Las cepas de referencia se obtuvieron de la Colección Nacional de Cultivos Tipo (NCTC por sus siglas en inglés “*National Collection of Type Culture*”) y de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa de referencia C2040103 (*P. multocida capF*) se obtuvo del Centro de Vigilancia Sanitaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid. Se utilizaron también cepas de referencia de *M. haemolytica* cedidas por el Dr. Robert Davies de la Universidad de Glasgow (Escocia) y por el Dr. László Fodor de la Universidad Szent István (Hungría).

Tabla 6: Cepas de referencia utilizadas en las técnicas aplicadas en este estudio.

Identificación	Serotipo Capsular	Sinónimos	Procedencia	Técnica en la que se utilizó
<i>Mannheimia haemolytica</i>				
NCTC 10609	A1	*	NCTC	HI
CECT 924	A2	ATCC 29694	CECT	IB, PCR- <i>lktA</i> , PCR FV1, 2 y 3 PCR IDMh-Bt
CECT 5941	A2	*	NCTC	HI
PH278	A2		R. Davies	IB
PH50	A5	*	R. Davies	HI
PH376	A6		R. Davies	IB
NCTC 10632	A6	*	NCTC	HI
PH296	A7	*	R. Davies	HI
NCTC 10634	A7	*	NCTC	HI
PH56	A8	*	R. Davies	HI
NCTC 10636	A8	*	NCTC	HI
PH238	A9	*	R. Davies	HI
NCTC 10638	A9	*	NCTC	HI
PH346	A12	*	R. Davies	HI
PH588	A13	*	R. Davies	HI
PH66	A14	*	R. Davies	HI
PH706	A16	*	R. Davies	HI
S66	A17	*	L. Fodor	IB, HI
<i>Bibersteinia trehalosi</i>				
PH68	T3	NCTC 11550	R. Davies	IB, HI
PH246	T4	NCTC 10626	R. Davies	HI
NCTC 10639	T4		NCTC	HI
NCTC 10641	T10		NCTC	IB, HI
PH254	T5	NCTC 10370	R. Davies	IB, HI
NCTC 10370	T15		NCTC	HI, PCR IDMh-Bt
<i>Mannheimia glucosida</i>				
PH344	A11		R. Davies	IB, HI, PCR IDMh-Bt, PCR FV2
6179	A11		L. Fodor	IB, HI
NCTC 10642	A11		NCTC	HI
<i>Pasteurella multocida</i>				
NCTC 10322	A	ATCC 43137	NCTC	PCR-CAP
NCTC 10323	B	ATCC 43017	NCTC	PCR-CAP
CECT 4325	D	NCTC 12178	CECT	PM-PCR, PCR-CAP, PCR-FV
NCTC 10326	E	ATCC 43020	NCTC	PCR-CAP
C2040103	F		UCM	PCR-CAP

*IB (identificación bioquímica), HI (Hemaglutinación indirecta), PM-PCR (PCR de identificación de *P. multocida*), PCR-CAP (PCR serotipo capsular de *P. multocida*), PCR-FV (PCR de factores de virulencia de *P. multocida*), PCR IDMh-Bt (PCR de identificación de *M. haemolytica* y *B. trehalosi*), PCR *lktA* (PCR de detección del gen *lktA* de *M. haemolytica*), PCR-FV1, 2 y 3 (PCR de factores de virulencia de *M. haemolytica*).

IV.4. CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS

Los aislados fueron conservados en el medio de congelación utilizando el sistema comercial CRIOTECA®-SKIM MILK (Microkit, España). Para la inoculación de las criotecas, se cogió una colonia de cada aislado y se resembró en agar sangre, se incubó a 37° C durante 24 horas.

La utilización de las criotecas se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los viales se almacenaron a temperatura de congelación de -80° C.

IV.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

IV.5.1. Pruebas bioquímicas (DIATABS) para la identificación de aislados de *Mannheimia*

Las colonias clasificadas como posibles *Mannheimia* o *Bibersteinia* (TH) fueron identificadas con las tabletas de diagnóstico bioquímico DIATABS® (ROSCO, Dinamarca). Se preparó una suspensión bacteriana con una turbidez de 4 en la escala de McFarland a partir de cultivos en agar sangre de 24 horas de incubación, se le adicionó una tableta en cada tubo conteniendo 0,25 ml de la suspensión, y se incubó a 37°C durante 24 horas. Las pruebas bioquímicas incluidas fueron las de: ODC (Ornitina descarboxilasa), ureasa, esculina, L-arabinosa, manitol, maltosa, manosa, trealosa, NPG (β -glucosidasa), ONPF (α -fucosidasa), ONPG (β -galactosidasa), D-xilosa, ramnosa y sorbitol. Al tubo que contenía la tableta de ODC se le adicionó unas gotas de aceite de parafina.

Las pruebas se evaluaron como positivas o negativas de acuerdo al color de la solución. La identificación final de las colonias se realizó teniendo en cuenta las características bioquímicas descritas para la Familia *Pasteurellaceae* en el Bergey's Manual of Bacteriology (Mutters *et al.*, 2005) y para los géneros *Mannheimia* y *Bibersteinia* por distintos estudios (Angen *et al.*, 1997a; Angen *et al.*, 1999a; Mutters *et al.*, 2005; Blackall *et al.*, 2007) respectivamente (Tabla 7). Para el control de calidad de las tabletas de identificación DIATABS® se utilizaron las cepas de referencia CECT924,

PH376, PH278 y S66 de *M. haemolytica*, NCTC10641, PH68 y PH254 de *B. trehalosi* y PH344 y 6179 de *M. glucosida*.

Tabla 7: Características bioquímicas diferenciales para la identificación de bacterias del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia*.

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES	PRELIMINARES								DIATABS® – ROSCO									
	Hemólisis	Mac Conkey	Catalasa	Oxidasa	Esculina	ONPF	ONPG	NPG	ODC	Maltosa	Trealosa	L-Arabinosa	D-Xilosa	Manosa	L-Ramnosa	D-Manitol	D-Sorbitol	Ureasa
<i>M. haemolytica</i>	+	+	+	+	-	+	V	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>M. glucosida</i>	+	V	+	+	v	+	+	+	V	+	-	V	+	+	-	+	+	-
<i>M. varigena</i>	+	-	+	+	- *	- *	V	-*	V	V	-	+	+	+	V	+	-	-
<i>M. ruminalis</i>	-	V	+	+	-	V	+	-	-	V	-	-	-	+	-	+	V	-
<i>M. granulomatis</i>	-	-	+	+	V	-	V	+	-	V	-	-	V	+	-	+	+	-
<i>B. trehalosi</i>	+	+	V	+	V	-	-	V	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-

(V) Variable. (*) Positivo el Taxón 36 de Bisgaard.

IV.5.2. Pruebas bioquímicas VITEK® para la identificación de aislados de *P. multocida*

Las colonias sospechosas de ser miembros del género *Pasteurella* (clasificadas como BNH) y las colonias sospechosas de otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae* (clasificadas como TNH) fueron identificadas mediante el sistema automático de identificación VITEK® (bioMérieux, España). Para ello, se utilizaron las tarjetas VITEK® 2GN, inoculadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las tarjetas se leyeron con el equipo VITEK® 2 COMPACT.

IV.6. EXTRACCIÓN DE ADN

IV.6.1. Aislados del complejo *Mannheimia-Bibersteinia*

La extracción de ADN se realizó con el uso del Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se almacenó en viales eppendorf a -20°C hasta el análisis de PCR.

IV.6.2. Aislados de *Pasteurella multocida*

El ADN bacteriano fue extraído por el método de ebullición. Las bacterias se cultivaron durante toda la noche en agar Columbia suplementado con sangre de cordero al 5% a 37°C durante 24 horas. Se recogieron 10 colonias de bacterias del cultivo fresco y se suspendieron en 1 ml de agua MiliQ estéril. La suspensión fue hervida durante 10 minutos a 99°C en el bloque de calentamiento Eppendorf® ThermoStat Plus (EE.UU.) para liberar el ADN; se centrifugó a 16000xg durante 3 minutos, y el sobrenadante se utilizó como ADN molde para las pruebas de PCR. El ADN extraído fue almacenado en condiciones de refrigeración a 4°C hasta su utilización.

IV.7. PCR DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

IV.7.1. PCR de Identificación de aislados de *Mannheimia-Bibersteinia*

Para la identificación molecular de los aislados del complejo *Mannheimia-Bibersteinia* se realizó una prueba de PCR múltiple, utilizando los cebadores descritos por Dassanayake *et al.* (2010) que se describen en la Tabla 9. El kit de PCR utilizado fue el Biotools DNA Polymerase 1U/ul with Standard Reaction Buffer y los dNTP's GeneAmp dNTP blend (Applied Biosystems). Las condiciones de la PCR fueron las mismas que las descritas por el autor (ver condiciones en Tabla 9) (Dassanayake *et al.*, 2010). Las concentraciones de los reactivos en el mix de PCR se describen en la Tabla 8.

Los productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% (Invitrogen, EE.UU.) teñido con SYBR Safe DNA gel stain (10.0000X). Las condiciones de electroforesis fueron de 70V durante 90 minutos. Los geles se

visualizaron en el equipo de UV Safe Imager™ (Invitrogen, EE.UU.). Las imágenes fueron obtenidas utilizando el equipo GENEFLASH Syngene Bio Imaging (TopoGEN, Port Orange, Florida). Se utilizaron como controles positivos las cepas de referencia CECT924 de *M. haemolytica* y la NCTC10370 de *B. trehalosi*.

Tabla 8: Concentración de los reactivos para la PCR múltiple de identificación de aislados del complejo *Mannheimia-Bibersteinia*

Reactivo	Concentración	Volumen (ul)
Agua MiliQ estéril	Ultrapura	16,4
Tampón de PCR + MgCl ₂	10 X/50mM	2.5
dNTP's	10 mM	1
Oligonucleótido (F) MhgcP	5 uM	0.5
Oligonucleótido (R) MhgcP	5 uM	0.5
Oligonucleótido (F) BtsodA	5 uM	1
Oligonucleótido (R) BtsodA	5 uM	1
Taq polimerasa	1 U/ul	0.15
ADN muestra		2.0
TOTAL	25 ul por reacción	

IV.7.2. PCR de Identificación de aislados de *Pasteurella multocida*

La identificación molecular de *P. multocida* se realizó mediante la técnica de PCR que amplifica un fragmento del gen *kmt1* específico de *P. multocida* (PM-PCR) utilizando los cebadores KMT1T7 y KMT1SP6 descritos por Townsend *et al.* (1998) (Tabla 9). Las condiciones de la PCR fueron las mismas que las descritas por los autores (ver condiciones en Tabla 9) (Townsend *et al.*, 1998). Para realizar la técnica se utilizó los reactivos Amplitaq Gold DNA Polymerase 5U/ul with Gold buffer (Applied Biosystems) y los dNTP's GeneAmp dNTP blend (Applied Biosystems). Las concentraciones de los reactivos se describen en la Tabla 10.

Los productos de PCR amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% (Invitrogen, EE.UU.) teñido con SYBR Safe DNA gel stain gel (10.0000X). Las condiciones de electroforesis fueron a 90V durante 60 minutos. Se utilizó como control positivo la cepa de referencia de *P. multocida* NCTC 10322.

Tabla 9: Cebadores y condiciones de las técnicas de PCR para la identificación de los aislados de *M. haemolytica*, *B. trehalosi* y *P. multocida*.

Oligo-nucleótidos	Secuencias (5' – 3')	Nº de bases	Gen	Localización dentro del gen	Amplicón (bp)	Nº de acceso Genbank	Condiciones de la PCR (º C/s)						Referencia
							Nº ciclos	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión Final	
KMT1T7	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	20	<i>kmt1</i>	213–232	457	AF016259	30	95/300	94/60	55/60	72/60	72/540	(Townsend <i>et al.</i> , 1998)
KMT1SP6	GCTGTAAACGAACTCGCCAC	20		669–649									
MHGCP-FWD	AGAGGCCAATCTGCAAACCTCG	22	<i>gcp</i>	147-168	266	AY839678	35	94/300	94/30	55/30	72/40	72/300	(Dassanayake <i>et al.</i> , 2010)
MHGCP-REV	GTTCTGATTGCCCAACGCCG	20		412-393									
BTSODA-FWD	GCCTGCGGACAAACGTGTTG	20	<i>sodA</i>	141-160	143	AY702549	35	94/300	94/30	55/30	72/40	72/300	(Dassanayake <i>et al.</i> , 2010)
BTSODA-REV	TTTCAACAGAACCAAAATCACGAATG	26		283-258									

Tabla 10: Concentración de los reactivos para la PCR de identificación de aislados de *P. multocida*

Reactivo	Concentración	Volumen (ul)
Agua MiliQ estéril	Ultrapura	18
Tampón de PCR + MgCl ₂	1 X/2 mM	2.5
dNTP's	10 μ M	1
Primer(KMT1T7)	5 μ M	0,5
Primer (KMT1SP6)	5 μ M	0,5
Taq polimerasa	0.5 U	0,5
ADN muestra		2
TOTAL	25 ul por reacción	

IV.8. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS POR SECUENCIACIÓN DEL ARN RIBOSOMAL 16S

Los aislados que no pudieron ser identificados por las pruebas bioquímicas y moleculares, fueron identificados por secuenciación del 16S ARN ribosomal utilizando los cebadores universales SSU-bact-27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y SSU-bact-907r (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') (Lane, 1991).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf, Reino Unido). Las condiciones de la PCR fueron un paso inicial de desnaturalización a 94° C durante 300 segundos, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/45 segundos, alineamiento a 53°C/60 segundos y extensión a 72°C/90 segundos y un último paso de extensión final a 72° C durante 600 segundos (Becker *et al.*, 2004).

El ADN amplificado fue purificado utilizando el kit GENECLAN® turbokit (MP Biomedicals, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se envió a secuenciar a Secugen (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 3730® DNA (Applied Biosystems). Para la secuenciación se utilizaron los mismos cebadores de la reacción de amplificación. Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el software Vector NTI® 11 Advance (Invitrogen, EE.UU.). Para comparar las secuencias se utilizaron secuencias incluidas en la base de datos del GenBank, a través

del programa FASTA (Pearson, 1994) y el software BLAST de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/nucleotide).

IV.9. DETERMINACIÓN DE BIOTIPOS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA*

La biotipificación de los aislados de *P. multocida* se realizó en función a los biotipos descritos por Fegan *et al.*, (1995) y Blackall *et al.*, (1997). Basada fundamentalmente en la capacidad de la bacteria de utilizar el manitol, dulcitol, D-sorbitol, D-trealosa, lactosa, maltosa, D-xilosa, L-arabinosa y en la producción de la enzima ornitina descarboxilasa, β -galactosidasa y ureasa (Tabla 11) (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997).

La galería de identificación VITEK® 2GN contiene los reactivos descritos, excepto por la prueba del dulcitol e indol, sin embargo, debido a discrepancias entre los resultados del VITEK al momento de definir el biotipo se realizaron adicionalmente las mismas pruebas bioquímicas de manera convencional. Se utilizó el Caldo Base Rojo fenol (Sigma Aldrich) y los discos de diferenciación de carbohidratos (Sigma Aldrich) para las reacciones de dulcitol, sorbitol, maltosa, trealosa, lactosa, xilosa y arabinosa.

La prueba de ODC se realizó utilizando el caldo Ornitina Descarboxilasa (Sigma Aldrich) y para la prueba de indol se utilizó el Caldo Indol y el reactivo de Kovacs (Sigma Aldrich). Los caldos de cultivo Rojo Fenol, Indol y Ornitina Base fueron preparados según las instrucciones del fabricante, dispensados en tubos de vidrio de 5 ml y autoclavados a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente se adicionó a cada tubo un disco de diferenciación de carbohidratos. Los tubos fueron inoculados con cultivos bacterianos obtenidos en placas de agar sangre de 18 horas de incubación. Después de la inoculación, los tubos fueron incubados a 37°C. Se realizó la lectura de los tubos a las 24 y 48 horas y se registraron los resultados.

Tabla 11: Biotipos descritos para *Pasteurella multocida* (Fegan *et al.*, 1995; Blackall *et al.*, 1997).

Propiedades bioquímicas	Biovars (Fegan <i>et al.</i> , 1995)*									Biovars (Blackall <i>et al.</i> , 1997)*			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14
Producción de ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Producción de ácido a partir de:													
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Trealosa	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Xilosa	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Subespecie de <i>P. multocida</i>	<i>Multocida</i>	<i>Multocida</i>	<i>multocida</i>	<i>multocida</i>	<i>Septica</i>	<i>Septica</i>	<i>Septica</i>	<i>gallicida</i>	<i>multocida</i> , ODC negativo	<i>Septica</i> , maltosa positiva	<i>multocida</i> , lactosa positiva	<i>multocida</i> , ODC negativo	<i>multocida</i> , lactosa positiva, ODC negativo

*Todos los aislados fueron oxidasa (+), catalasa (+), glucosa (+), manitol (+), sucrosa (+), β -galactosidasa (-), no hemolíticos y no crecieron en agar Mac Conkey.

IV.10. DETERMINACIÓN DE SUBESPECIES DE *PASTEURELLA MULTOCIDA*

La determinación de la subespecie se realizó en base a la fermentación del sorbitol y dulcitol (Mutters *et al.*, 1985). Según el patrón de fermentación de estos azúcares se determinó la subespecie de cada uno de los aislados, según la Tabla 12.

Tabla 12: Características bioquímicas de subespecies de *P. multocida*.

Subespecie	Dulcitol	D-Sorbitol
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	-	+
<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	-	-
<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	+	+

IV.11. DETERMINACIÓN DEL SEROTIPO CAPSULAR DE AISLADOS DEL COMPLEJO *MANNHEIMIA- BIBERSTEINIA* POR HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA (HI)

La serotipificación de las cepas identificadas como parte del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia* se realizó siguiendo la técnica de Hemaglutinación indirecta descrita por (Biberstein, 1978). Los antisueros para cada uno de los serotipos fueron producidos en conejos utilizando las cepas de referencia (serotipos del A1, A2, A5-A9, A11, A12-A14, A16) de la NTCC y las proporcionadas por el Dr. Robert Davies (Escocia), el serotipo A17 fue proporcionado por el Dr. László Fodor (Hungría).

La técnica de hemaglutinación indirecta se basa en la utilización de eritrocitos como soporte para la adhesión de antígenos solubles. La reacción inmunológica con un suero que contiene anticuerpos específicos frente a ese antígeno se puede visualizar macroscópicamente como una reacción de hemaglutinación.

IV.11.1. Producción de antisueros

Para la técnica de HI se produjeron sueros con anticuerpos específicos frente al antígeno a evaluar por inoculación en conejo. Se produjeron antisueros contra los 12 serotipos de *M. haemolytica* (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) y el serotipo A11 identificado actualmente como *M. glucosida*. Para producir los

antisueros se inocularon conejos albinos de Nueva Zelanda, de entre 2 a 2,5 Kg de peso.

IV.11.1.1 Inoculación de conejos

- a. Las cepas bacterianas de cada uno de los serotipos a inocular se cultivaron en AS (bioMerieux) y se incubaron a 37°C durante 4 horas, tiempo de máxima expresión de la cápsula.
- b. Las colonias aisladas se suspendieron en caldo PBS con 0.5% (v/v) de formalina hasta alcanzar una concentración de $1,2 \times 10^9$ bacterias/ml (suspensión 4 en la escala de McFarland). Se homogenizó y se incubó a 4°C durante 24 horas.
- c. La suspensión se inyectó en la vena marginal de la oreja de los conejos siguiendo la pauta de inoculación descrita en la tabla 13.

Tabla 13: Pauta de inoculación de conejos

Inyección	Suspensión bacteriana	Día
1	0,25 ml formalinizadas	1
2	0,50 ml formalinizadas	5
3	1 ml formalinizadas	10
4	1 ml formalinizadas	15
5	1 ml vivas	20
6	1 ml vivas	25

- d. Diez días después de la última administración del preparado antigénico, se extrajo la sangre por punción de la arteria de la oreja. Los animales fueron sacrificados inyectándoles 1,5 ml de Eutalender® (Pentobarbital sódico) (Normon, España).
- e. La sangre se dejó coagular y se recogieron los sueros para su titulación.

Las cepas bacterianas utilizadas para producir los antisueros se describen en la tabla 14.

Tabla 14: Lista de cepas control utilizadas para producir antisueros y diluciones de ensayo utilizadas

Cepas control			Antisueros producidos		
Cepa bacteriana	Especie bacteriana	Origen cepa	Serotipo	Título del suero	Dilución de trabajo
NCTC 10609	<i>M. haemolytica</i>	NCTC	A1	1/640	1/100
CECT5941	<i>M. haemolytica</i>	CECT	A2	1/160	1/80
PH50	<i>M. haemolytica</i>	R. Davies	A5	1/320	1/100
NCTC10632	<i>M. haemolytica</i>	NCTC	A6	1/1280	1/200
NCTC10634	<i>M. haemolytica</i>	NCTC	A7	1/160	1/80
PH296	<i>M. haemolytica</i>	R. Davies	A7D	1/2160	1/200
NCTC10636	<i>M. haemolytica</i>	NCTC	A8	1/160	1/80
PH56	<i>M. haemolytica</i>	R. Davies	A8D	1/640	1/100
NCTC10638	<i>M. haemolytica</i>	NCTC	A9	1/160	1/80
PH238	<i>M. haemolytica</i>	R. Davies	A9D	1/2160	1/200
NCTC10642	<i>M. glucosida</i>	NCTC	A11	1/5120	1/500
PH346	<i>M. haemolytica</i>	R. Davies	A12	1/2160	1/200
PH588	<i>M. haemolytica</i>	R. Davies	A13	1/2160	1/200
PH66	<i>M. haemolytica</i>	R. Davies	A14	1/320	1/100
PH706	<i>M. haemolytica</i>	R. Davies	A16	1/2160	1/200
S66	<i>M. haemolytica</i>	I. Fodor	A17	1/320	1/100

NCTC: National Collection of Type Culture, CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

IV.11.1.2. Preparación de antisueros

- Los sueros se colectaron por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos y se almacenaron a -20° C.
- Se inactivó el complemento calentando los sueros a 56° C en baño maría durante 30 minutos.
- Los sueros extraídos fueron titulados con la técnica de hemaglutinación indirecta. Los títulos de los sueros obtenidos, así como, la dilución de trabajo se describen en la tabla 14.

Las diluciones de trabajo se prepararon diluyendo el suero en solución salina. Se añadió Azida Sódica para su conservación.

IV.11.2. Prueba de Hemaglutinación Indirecta

La técnica de hemaglutinación indirecta se utilizó en dos fases, en la primera fase se utilizó para titular los antisueros producidos en conejos, que posteriormente serían utilizados en la segunda fase para identificar el antígeno capsular de los aislados de campo.

IV.11.2.1. Fijación de eritrocitos con glutaraldehído

Para la técnica de hemaglutinación indirecta, se utilizaron eritrocitos de carnero fijados con una solución de glutaraldehído (Bing et al, 1967). Los eritrocitos fueron fijados de la siguiente manera:

- a. Los eritrocitos frescos (Durviz) se centrifugaron a 3000 rpm (ó 650xg) durante 20' a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con 5 volúmenes de solución salina al 0,85% (NaCl 0.15M).
- b. Luego del último lavado el paquete celular se suspendió en PBS para producir una suspensión de eritrocitos al 10% (v/v), y se refrigeró a 4º C en baño de hielo.
- c. El glutaraldehído al 25% fue diluido a 1% (v/v) con una solución de PBS.
- d. La solución salina de glutaraldehído se refrigeró a 4º C y se usó para diluir el paquete celular en 1 o 2% (v/v).
- e. La fijación se realizó adicionando lentamente con una pipeta los eritrocitos gota a gota a la solución de glutaraldehído en igual volumen en baño de hielo con agitación vigorosa (Lam et al, 1974).
- f. La mezcla de eritrocitos con glutaraldehído se incubó a 4º C durante 30' y luego 30' más con agitación ocasional durante el periodo de fijación.
- g. Los eritrocitos fijados se colectaron por centrifugación a 3000 rpm (650xg) durante 10' a 25º C y se lavaron 10 veces con una solución de NaCl 0.15M por centrifugación. El volumen del lavado fue de aproximadamente 1/10 de la mezcla de eritrocitos + glutaraldehído.

- h. Los eritrocitos se suspendieron en una cantidad suficiente de tampón fosfato de sodio 0.11M, pH 7.3, obteniendo una suspensión celular al 30%.
- i. Se adicionó 1:10,000 (v/v) de Azida sódica y se almacenó a 4º C.

Los eritrocitos fijados con glutaraldehído son de color rojo brillante inmediatamente después de la fijación y van oscureciéndose gradualmente hacia marrón con los lavados sucesivos; el color final es ligeramente más claro que los fijados con formalina.

IV.11.2.2. Preparación del antígeno y sensibilización de eritrocitos

- a. Se sembró una placa de AS Columbia con la bacteria a evaluar y se incubó durante 18 horas a 37º C.
- b. Se cogió una única colonia de la superficie del agar y se resuspendió en 1 ml de PBS + 0,3% de formaldehído neutro en tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (“eppendorf”). La suspensión bacteriana se trató en baño maría a 56º (60ºC) durante 30 minutos para liberar el antígeno capsular.
- c. A la suspensión tratada térmicamente (sin centrifugar) se añadió 100 µl de una suspensión al 5% de eritrocitos fijados con glutaraldehído. La mezcla se incubó a 37º C durante 30 minutos.
- d. Los hematíes sensibilizados se lavaron tres veces con PBS + 0,3% de formaldehído neutro en microcentrífuga.

IV.11.2.3. Procedimiento de la técnica de HI

IV.11.2.3.1. Titulación de sueros producidos en conejos

- a. En una placa de microtitulación se prepararon las diluciones de los sueros y se siguieron los pasos indicados en la Figura 2.
- b. Se utilizaron 2 controles:
 - ◇ Eritrocitos sin sensibilizar (que sirvió para detectar posibles reacciones inespecíficas con sustancias propias de los eritrocitos).
 - ◇ Suero de conejo no inoculado.

- c. Las placas de microtitulación fueron incubadas por 2 horas a 37°C y luego por toda la noche a temperatura ambiente.
- d. La última dilución en la cual ocurrió hemaglutinación se consideró el punto final y se expresó el título de acuerdo a esto.
 - ◇ Se consideró una muestra POSITIVA cuando los eritrocitos habían aglutinado y estaban distribuidos de manera homogénea.
 - ◇ Se consideró una muestra NEGATIVA, cuando los eritrocitos no aglutinaron y sedimentaron en el fondo del microtubo.

IV.11.2.3.2. Detección del antígeno capsular en cepas de campo

- a. Las cepas de campo fueron sembradas en placas de agar sangre y se preparó el antígeno como se indica en el punto IV.11.4.2.
- b. Se sensibilizaron eritrocitos según el punto IV.11.4.2.
- c. En una placa de microtitulación se agregó 25 μ l de cada antisuero producido a cada pocillo, como se indica en la Figura 3.
- d. Se adicionó 25 μ l de eritrocitos sensibilizados con la cepa problema
- e. Se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente.
- f. Las placas fueron examinadas para determinar en qué pocillo hubo aglutinación.
- g. Se consideró positivo o negativo siguiendo los mismos criterios utilizados en la técnica de HI para titular anticuerpos.

Figura 2: Esquema del procedimiento de HI para titular anticuerpos

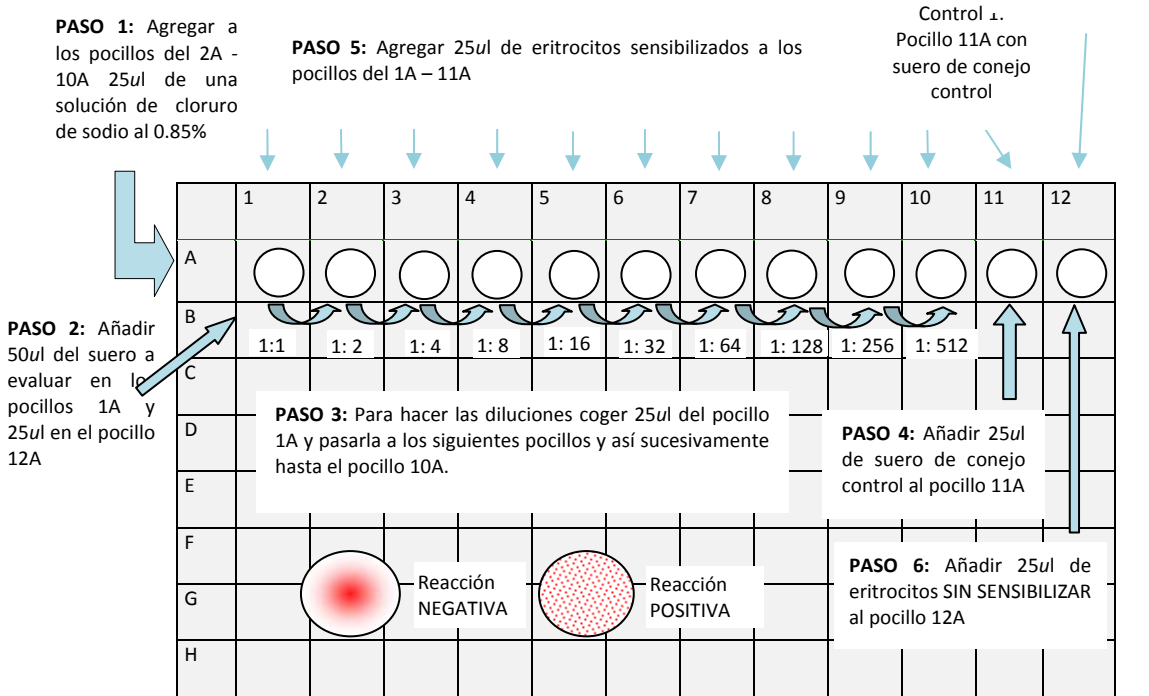
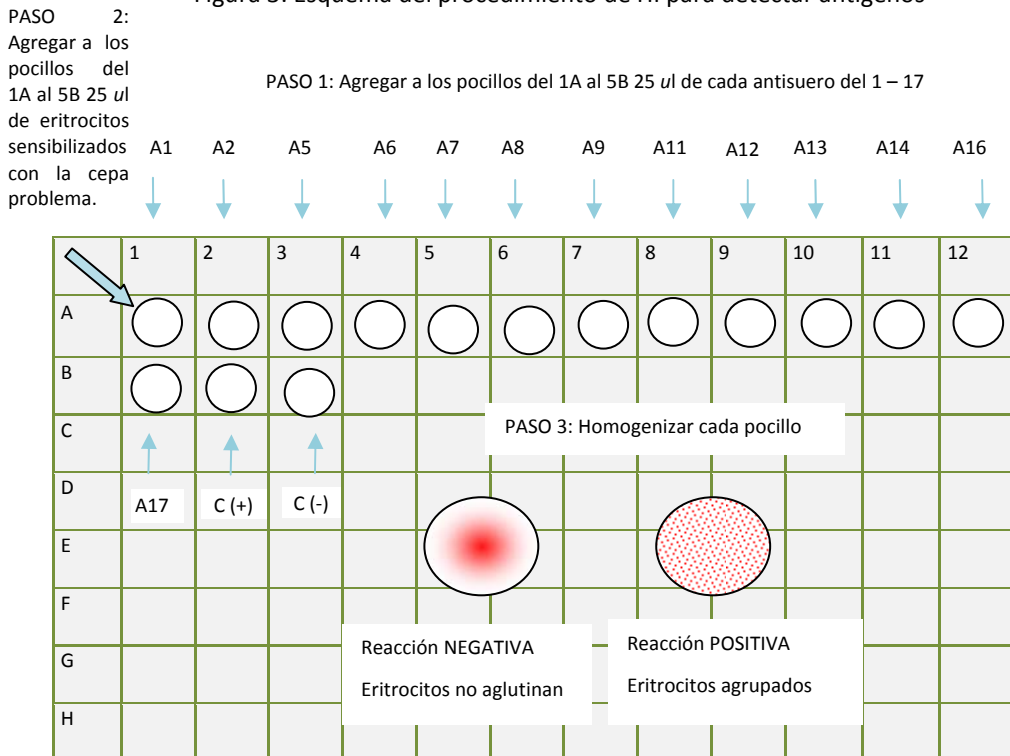


Figura 3: Esquema del procedimiento de HI para detectar antígenos



IV.12. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *MANNHEIMIA-BIBERSTEINIA* POR PCR

IV.12.1. Detección del gen *lktA* que codifica la proteína estructural de la Leucotoxina

La detección del gen *lktA* de la Leucotoxina se realizó en todas las cepas identificadas como parte del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia*, utilizando la técnica de PCR (PCR-*lktA*) descrita por Fisher *et al* (1999). Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 17. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el Kit AmpliTaq® Gold DNA Polymerase with GeneAmp® 10X PCR buffer (Applied Biosystems) (Fisher *et al.*, 1999). El volumen y la concentración de cada reactivo se describen en la Tabla 15.

Los productos de la PCR fueron visualizados mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 10X teñido con SYBR Safe DNA stain gel (10.0000X) (10ul/100ml), a 90V durante 50 minutos. Los geles se visualizaron en el transiluminador UV Safe ImagerTM (Invitrogen, EE.UU.). Las imágenes fueron obtenidas utilizando el equipo GENEFLASH Syngene Bio Imaging (TopoGEN, Port Orange, Florida). Se identificaron como positivas las muestras que presentaron productos de PCR de 1045 bp. Se utilizaron como cepas patrón la CECT924 de *M. haemolytica* y NCTC 10370 de *B. trehalosi*.

Tabla 15: Volumen y concentración de reactivos en el mix de PCR para identificar el gen *lktA*.

Reactivo	Concentración	Volumen (ul)
Agua MiliQ estéril	Ultrapura	36.7
Tampón de PCR	1 X	5
MgCl ₂	1.5 mM	3
dNTP's	150 uM	0.5
Cebador (F)	1.9 uM	1
Cebador (R)	1.9 uM	1
Taq polimerasa	1.5 U	0.3
ADN muestra	0.5 ul	2.5
TOTAL	50 ul por reacción	

IV.12.2. Detección de otros factores de virulencia del complejo M-B.

Se analizaron quince genes asociados a la virulencia (*adhes*, *fhaC*, *gcp*, *hf*, *irp*, *lpsA*, *nanH*, *pilA*, *plpD*, *pomA*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *tbpB* y *tonB*) en cepas de *M. haemolytica* (Tabla 16) (Highlander, 2001; Ewers, 2006). Los genes fueron agrupados en tres grupos, de cinco genes cada uno con el objetivo de diseñar los cebadores con las condiciones necesarias para ser analizados en PCR's múltiples. Los genes estudiados codifican proteínas que intervienen en los mecanismos de patogenicidad.

Los cebadores fueron diseñados con el programa Primer 3 Input (versión 0.4.0). Estos fueron optimizados para ser utilizados en PCR's múltiples. Para el diseño de los cebadores se realizó un alineamiento múltiple de todas las secuencias disponibles, para cada uno de los genes, con el programa Vector NTI® 11 Advance (Invitrogen, EE.UU.) con el objetivo de detectar secuencias homologas. Las secuencias fueron descargadas de la base de datos del GenBank. Solo en el caso del gen *tbpB* donde se observó poca homología entre las secuencias descargadas se diseñaron tres pares de cebadores para detectar el mismo gen, los cebadores TBPB1, TBPB2 Y TBPB3.

Se diseñaron tres PCR's múltiples:

1. FV1-PCR: se utilizó para estudiar los genes *pomA*, *gcp*, *irp*, *sodA* y *sodC*. Los cebadores utilizados para desarrollar esta PCR fueron los descritos por Ewers (2006) con modificación de los cebadores para optimizar la PCR múltiple, estos y las condiciones utilizadas se describen en la tabla 17. Las concentraciones de los reactivos se describen en la Tabla 18.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,5% sometido a un campo de electroforesis a 70V durante 90 minutos.

Se utilizó como control positivo la cepa CECT924 de *M. haemolytica* positiva a los cinco genes evaluados.

2. FV2-PCR: se utilizó para estudiar los genes *nanH*, *fhaC*, *tonB*, *tbpA* y *tbpB*. Los cebadores utilizados para desarrollar esta PCR y las condiciones utilizadas se describen en la Tabla 17. Las concentraciones de los reactivos se describen en la tabla 18. Esta PCR se realizó en dos pasos: en el primer paso se utilizó una mezcla con los cebadores NANH, TONB, FHAC, TBPA y TBPB1.

Tabla 16: Factores de virulencia estudiados en aislados del complejo *Mannheimia-Bibersteinia*.

Gen	Proteína que codifica	Función	PCR
<i>lktA</i>	Leucotoxina	Toxina formadora de poro	PCR- <i>lktA</i>
<i>pomA</i>	Proteína de membrana externa (<i>ompA</i> -like)	Determinante de virulencia, posible antígeno protector	FV1-PCR
<i>Gcp</i>	Glicoproteasa	Favorece la adhesión a la célula hospedadora	
<i>Irp</i>	Proteína receptora de hierro	Proteína reguladora de la captación de hierro dependiente de <i>tonB</i>	
<i>sodA</i>	Superoxidodismutasa	Rol en la acción de los radicales libres, protege a la bacteria durante el estallido respiratorio.	
<i>sodC</i>	Superoxidodismutasa		
<i>nanH</i>	Neuraminidasa	Hidroliza glicoproteínas celulares favoreciendo la multiplicación bacteriana.	FV2-PCR
<i>fhaC</i>	Proteína activadora de hemaglutinina	Activa la hemaglutinina	
<i>tonB</i>	Sistema de adquisición de hierro	Aporta energía para internalizar el hierro captado al interior de la bacteria	
<i>tbpA</i>	Proteína A de unión a transferrina	Captación de hierro procedente de la transferrina	
<i>tbpB</i>	Proteína A de unión a transferrina		
<i>lpsA</i>	Lipopolisacárido (glicosiltransferasa)	Determinantes antigénicos	FV3-PCR
<i>plpD</i>	Lipoproteína		
<i>pilA</i>	Pili		
<i>MHA_0708 (adhes)</i>	Posible adhesina	Adherencia a la célula hospedadora	
<i>MHA_0866 (hf)</i>	Posible hemaglutinina filamentosa	Favorecer la adhesión de la bacteria a fagocitos.	

Tabla 17: Cebadores y condiciones de las pruebas de PCR utilizadas para la detección de genes asociados a factores de virulencia en aislados del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia*.

Cebadores	Secuencias (5' – 3')	Nº de bases	Gen	Localización dentro del gen	Amplicón (bp)	Nº de acceso Genbank	Condiciones de la PCR (° C/s)						Referencia
							Nº ciclos	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión Final	
LKTA-FWD	TGTGGATGCGTTTGAAGAAGG	21	<i>lktA</i>	1485-1505	1145	M24197	30	94/60	94/60	55/60	72/60	72/600	(Fisher <i>et al.</i> , 1999)
LKTA-REV	ACTTGCTTTGAGGTGATCCG	20		2630-2611									
POMA-FWD	ATACCGTTTCGGTCAAGGTG*	20	<i>pomA</i>	693-712	310	AF133259	25	94/240	94/30	58/45	68/210	72/600	(Ewers, 2006)
POMA-REV	TACAGCTGTTACATTAGCTG	20		1002-983									
GCP-FWD	GTGTTGCCATTATGATGAAG	21	<i>gcp</i>	41-61	912	U15958	25	94/240	94/30	58/45	68/210	72/600	(Ewers, 2006)
GCP-REV	AGCGAAGAAAGCCAGTGTA	19		952-934									
IRP-FWD	GGCGAAAACCTAGATATGTCGG	22	<i>irp</i>	313-334	1025	AY028475	25	94/240	94/30	58/45	68/210	72/600	(Ewers, 2006)
IRP-REV	CCTAAATTAAGGCGTTCAATCG	22		1337-1316									
SODA-FWD	TACCAGAATTAGGCTACGC	19	<i>sodA</i>	14-32	624	L47537	25	94/240	94/30	58/45	68/210	72/600	(Ewers, 2006)
SODA-REV	TCGCACAACCGCAGTTGCT	20		637-618									
SODC-FWD	AAGGTGGCAAGCTCACAGCAG	21	<i>sodC</i>	13-33	230	U59225	25	94/240	94/30	58/45	68/210	72/600	(Ewers, 2006)
SODC-REV	TGAGTGTTATCGCGCCT	19		224-242									
NANH-FWD	GCTGAAATGGAAGCAAAAGC	20	<i>nanH</i>	1258-1277	660	EF215852	30	94/180	94/40	55/60	72/120	72/600	Este estudio
NANH-REV	GCCACGATAGCGTAAGAAGC	20		1917-1898									
TONB-FWD	CGTTGCTCCGGATCCTATTA	20	<i>tonB</i>	171-190	504	U62565	30	94/180	94/40	55/60	72/120	72/600	Este estudio
TONB-REV	CGCTGTAATGCTCGCTGTAA	20		674-655									
FHAC-FWD	TTCACCGTCAAATCCACGTA	20	<i>fhaC</i>	280-299	207	NZ_DS 264614 ^a	30	94/180	94/40	55/60	72/120	72/600	Este estudio
FHAC-REV	TCTGCTCCCGAGGAAGATTA	20		286-267									
TBPA-FWD	TGCCCAATATACCAAAGGCG	20	<i>tbpA</i>	1620-1639	285	DQ680193	30	94/180	94/40	55/60	72/120	72/600	Este estudio
TBPA-REV	CGATAAGTTCGGCTAAGTGT	20		1904-1885									
TBPB1-FWD	ATGGGTATGTTTACTATTTAGG	22	<i>tbpB1</i>	491-512	1221	DQ680199	30	94/180	94/40	55/60	72/120	72/600	Este estudio
TBPB1-REV	CTTTATCCGTTTCTGCACTATG	22		1711-1691									

...continuación.

Cebadores	Secuencias (5' – 3')	Nº de bases	Gen	Localización dentro del gen*	Amplicón (bp)	Nº de acceso Genbank	Condiciones de la PCR (º C/s)						Referencia
							Nº ciclos	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión Final	
TBPB2-FWD	CCAGGCAAGCCATTATCTCT	20	<i>tbpB2</i>	211-230	1046	AY850246	30	94/180	94/40	55/60	72/120	72/600	Este estudio
TBPB2-REV	GCAACTGCCGTACGTTACACC	20		1256-1237									
TBPB3-FWD	CGACCGATGCAAGAAAAGAT	20	<i>tbpB3</i>	491-510	933	AY850256	30	94/180	94/40	55/60	72/120	72/600	Este estudio
TBPB3-REV	GACGCTCTTCAACACCATCA	20		1423-1404									
LPSA-FWD	AAATTCTGCTCCCTTGTTTCG	20	<i>lpsA</i>	319-348	385	NZ_DS 264626 ^b	30	94/180	94/30	56/40	72/60	72/600	Este estudio
LPSA-REV	ATTTTTCGATGCGATTACGC	20		703-684									
PLPD-FWD	GACGGTTAGGGCGTAAACAA	20	<i>plpD</i>	117-136	436	NZ_DS 264623 ^c	30	94/180	94/30	56/40	72/60	72/600	Este estudio
PLPD-REV	TACCGTGAAAATGGCGTACA	20		552-533									
PILA-FWD	TTTtagaccgcttgGCATTc	20	<i>pilA</i>	18-37	311	NZ_DS 264612 ^d	30	94/180	94/30	56/40	72/60	72/600	Este estudio
PILA-REV	CCGTAATCACGCCTTTTGTT	20		328-309									
ADHES-FWD	CCACATTTTGAGGCGCTAAT	20	<i>MHA_0708</i>	750-769	155	NZ_DS 264613 ^e	30	94/180	94/30	56/40	72/60	72/600	Este estudio
ADHES-REV	AGGTCATCCGGCAACTACAC	20		904-885									
HF-FWD	TCGCTCGCTTTCGTTTTAT	20	<i>MHA_0866</i>	2365-2384	621	NZ_DS 264614 ^f	30	94/180	94/30	56/40	72/60	72/600	Este estudio
HF-REV	GCGAGTGTGGGCGTATTAT	20		2985-2966									

*Este oligonucleótido fue modificado en este estudio para mejorar las condiciones de la PCR múltiple. a. Región seleccionada de la base 60430 a 62226. b. Región seleccionada de la base 6680 a 7471. c. Región seleccionada de la base 5254 a 6108. d. Región seleccionada de la base 92192 A 92671. e. Región seleccionada de la base 3678 A 5678. f. Región seleccionada de la base 50734 a 60378.

Tabla 18: Concentraciones de los reactivos utilizados en las pruebas de PCR múltiple.

Reactivo	FV1-PCR (<i>pomA</i> , <i>gcp</i> , <i>irp</i> , <i>sodA</i> y <i>sodC</i>)		FV2-PCR (<i>nanH</i> , <i>tonB</i> , <i>fhaC</i> , <i>tbpA</i> y <i>tbpB1</i>)*		FV3-PCR (<i>lpsA</i> , <i>plpD</i> , <i>pilA</i> , MHA_0708 y MHA_0866)	
	Concentración	Volumen (ul)	Concentración	Volumen (ul)	Concentración	Volumen (ul)
Agua MiliQ estéril	Ultrapura	13,5	Ultrapura	9,1	Ultrapura	11
Tampón de PCR + MgCl ₂	1 X/2mM	2,5	1 X/2mM	2,5	1 X/2mM	2,5
dNTP's	10 mM	1	10 mM	1,7	10 mM	1
5 Cebadores (F) c/u	5 uM	0.5	5 uM	0,6/1,2	5 uM	0,5/1
5 Cebadores (R) c/u	5 uM	0.5	5 uM	0,6/1,2	5 uM	0,5/1
Taq polimerasa	1 U/ul	0.5	5 U/ul	0,4	1 U/ul	0,5
ADN muestra	0.5 ul	2,5	0.5 ul	2	0.5 ul	3
TOTAL	25 ul por reacción		25 ul por reacción		25 ul por reacción	

*En la segunda fase se utilizaron los cebadores *tbpB1* y *tbpB2*

En un segundo paso los aislados que dieron negativo al gen *tbpB* fueron posteriormente analizados con una PCR múltiple que incluyó los cebadores TBPB2 Y TBPB3.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,5% sometido a un campo de electroforesis a 90V durante 60 minutos.

Se utilizaron como controles positivos las cepas CECT924 de *M. haemolytica* (*nanH*, *tonB*, *tbpA*, *fhaC* y *tbpB2*), PH344 (*tbpB1*) de *M. glucosida* y NCTC10639 (*tbpB3*) de *B. trehalosi*.

3. FV3-PCR: se utilizó para estudiar los genes *lpsA*, *plpD*, *pilA*, *MHA_0866* (*hf*) y *MHA_0708* (*adhes*). Los cebadores utilizados para desarrollar esta PCR y las condiciones utilizadas se describen en la Tabla 17. Las concentraciones de los reactivos se describen en la Tabla 18.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% sometido a un campo de electroforesis a 70V durante 90 minutos. Se utilizó como control positivo la cepa CECT924 de *M. haemolytica* positiva a los cinco genes evaluados.

Un primer paso de estandarización de las PCR múltiples se llevó a cabo utilizando todas las cepas de referencia descritas en este estudio. Los productos obtenidos fueron purificados para obtener el ADN amplificado y enviados a secuenciar para confirmar que los cebadores hayan amplificado la secuencia diana.

IV. 13. DETERMINACIÓN DEL SEROTIPO CAPSULAR DE *P. MULTOCIDA* POR PCR

El tipo capsular de los aislados de *P. multocida* se determinó mediante la técnica de PCR múltiple descrita por Townsend *et al.* (2001), utilizando pares de cebadores específicos para cada tipo capsular (*capA*, *capB*, *capD*, *capE* y *capF*), con la única modificación de que los cebadores para la PM-PCR no fueron incluidos en la mezcla de reacción de PCR.

La secuencia de los cebadores utilizados en la técnica de PCR múltiple capsular se enumera en la Tabla 20. Las concentraciones de todos los reactivos se describen en la Tabla 19. Las condiciones de la técnica fueron las descritas por Townsend *et al.* (2001)

con pequeñas modificaciones que se enumeran en la Tabla 20. Los productos de los genes amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Invitrogen, EE.UU.) a 90V marcadas con SYBR Safe DNA gel stain (10.0000X), y se visualizaron en el equipo de UV Safe Imager™ (Invitrogen, EE.UU.). Las imágenes fueron obtenidas utilizando el equipo GENEFLASH Syngene Bio Imaging (TopoGEN, Port Orange, Florida).

Se utilizaron como controles positivos las cepas de referencia de cada uno de los tipos capsulares de *P. multocida* NCTC 10322 (*capA*), NCTC 10323 (*capB*), 10326 NCTC (*capE*), y 962 CECT (*capD*) y C2040103 (*capF*).

Tabla 19: Concentración de los reactivos para la PCR múltiple de identificación del serotipo capsular en aislados de *Pasteurella multocida*

Reactivo	Concentración	Volumen (ul)
Agua MiliQ estéril	Ultrapura	13
Tampón de PCR + MgCl ₂	1 X/2mM	2.5
dNTP's	10 mM	1
5 Cebadores (F) c/u	5 uM	0.5
5 Cebadores (R) c/u	5 uM	0.5
Taq polimerasa	1 U	0.5
ADN muestra	0.5 ul	3.0
TOTAL	25 ul por reacción	

IV.14. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *PASTEURELLA MULTOCIDA* POR PCR.

Se determinó la presencia de cuatro genes de virulencia en cepas de *P. multocida*. La detección de los genes de virulencia *pfhA*, *hgbB*, *tbpA* y *toxA*, se realizó mediante la técnica de PCR múltiple descrita por Atashpaz *et al.* (2009). Los cebadores utilizados para la PCR múltiple se muestran en la Tabla 20. Las condiciones de la PCR fueron las mismas que las descritas por el autor (Atashpaz *et al.*, 2009). Las concentraciones de los reactivos se describen en la Tabla 21. Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1% por electroforesis a 90V durante 45 minutos, y los resultados fueron grabados con el sistema de documentación de geles GENEFLASH Syngene Bio

Tabla 20: Cebadores y condiciones de las pruebas de PCR utilizadas para la serotipificación capsular y detección de genes asociados a factores de virulencia en aislados de *P. multocida*.

Cebadores	Secuencias (5' – 3')	Nº de bases	Gen	Localización dentro del gen	Amplicón (bp)	Nº de acceso Genbank	Condiciones de la PCR (º C/s)						Referencia
							Nº ciclos	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión Final	
CAPA-FWD	TGCCAAAATCGCAGTCAG	18	<i>hyaD-hyaC</i>	8846–8863	1046	AF067175	30	95/180	95/30	54/60	72/90	72/300	(Townsend <i>et al.</i> , 2001)
CAPA-REV	TTGCCATCATTGTCACTG	18		9891–9874									
CAPB- FWD	GCCCGAGAGTTTCAATCC	19	<i>bcbD</i>	12258–12275	759	AF169324	30	95/180	95/30	54/30	72/90	72/300	(Townsend <i>et al.</i> , 2001)
CAPB-REV	CATTATCCAAGCTCCACC	18		13016–12998									
CAPD-FWD	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	24	<i>dcbF</i>	3142–3165	648	AF302465	30	95/180	95/30	54/30	72/90	72/300	(Townsend <i>et al.</i> , 2001)
CAPD- REV	CATCTACCCACTCAACCATATCAG	24		3789–3766									
CAPE-FWD	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	21	<i>ecbJ</i>	4388–4408	514	AF302466	30	95/180	95/30	54/30	72/90	72/300	(Townsend <i>et al.</i> , 2001)
CAPE-REV	GCTTGCTGCTTGATTTTGTG	20		4901–4882									
CAPF-FWD	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	22	<i>fcbD</i>	2882–2903	852	AF302467	30	95/180	95/30	54/30	72/90	72/300	(Townsend <i>et al.</i> , 2001)
CAPF-REV	TTCCGCCGTCAATTACTCTG	20		3733–3714									
TOXA-FWD	TCTTAGATGAGCGACAAGG ^a	19	<i>toxA</i>	1877–1895	865	AF240778	30	95/300	94/45	54/50	72/50	72/600	(Lichtensteiger <i>et al.</i> , 1996)
TOXA-REV	GAATGCCACACCTCTATAG	19		2742–2724									
TBPA-FWD	TGGTTGGAAACGGTAAAGC ^a	19	<i>tbpA</i>	970–988	728	AY007725	30	95/300	94/45	54/50	72/50	72/600	(Ewers <i>et al.</i> , 2006)
TBPA-REV	TAACGTGTACGGAAGCC ^a	19		1697–1679									
HGBB-FWD	TCATTGAGTACGGCTTGAC	19	<i>hgbB</i>	395653–395671	500	AE004439	30	95/300	94/45	54/50	72/50	72/600	(Atashpaz <i>et al.</i> , 2009)
HGBB-REV	CTTACGTACGTAACACTCG	19		396152–396134									
PFHA-FWD	AGCTGATCAAGTGGTGAAC	19	<i>pfhA</i>	2408–2427	276	AY035342	30	95/300	94/45	54/50	72/50	72/600	(Ewers <i>et al.</i> , 2006)
PFHA-REV	TGGTACATTGGTGAATGCTG	20		2684–2665									

a. Estos cebadores fueron desarrollados por las referencias indicadas, pero fueron modificados por Atasphaz *et al.*, (2009) para mejorar las condiciones de la PCR múltiple.

Imagen (TopoGEN, Port Orange, Florida). Todas las pruebas se repitieron dos veces en paralelo con los correspondientes controles positivos y negativos.

Tabla 21: Volumen y concentración de cada reactivo en el mix de PCR múltiple para identificar los genes *toxA*, *tbpA*, *hgbB* y *pfhA*

Reactivo	Concentración	Volumen (ul)
Agua MiliQ estéril	ultrapura	31
Tampón de PCR + MgCl ₂	1 X/2 mM	5
dNTP's	20 mM	2
4 Cebadores (F) c/u	5 uM	1
4 Cebadores (R) c/u	5 uM	1
Taq polimerasa	1 U	1
ADN muestra	0.8 ul	3
TOTAL	50 ul por reacción	

Cepas de referencia de cada uno de los tipos capsulares de *P. multocida* NCTC10322 (*pfhA*), NCTC10323 (*tbpA*) y 962 CECT (*toxA*, *tbpA*, *hgbB* y *pfhA*) se obtuvieron de la Colección Nacional de Cultivos Tipo (NCTC) y de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

IV.15. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

IV.15.1. Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de *Mannheimia-Bibersteinia*

Se evaluó el perfil de resistencia a los antimicrobianos mediante la técnica del disco difusión (Método de Kirby Bauer). La técnica se llevo a cabo siguiendo las recomendaciones de la norma del Instituto de Estándares clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés "*Clinical and Laboratory Standards Institute*"; anteriormente llamada NCCLS) (CLSI, 2008). Los antibióticos analizados y la potencia utilizada se observan en la Tabla 22.

Tabla 22: Lista de antibióticos evaluados en el antibiograma.

Familia Antibiótica	Antibiótico	Potencia (ug)
Betalactámicos Penicínicos	Amoxicilina	30
	Penicilina	5
Betalactámicos Clavámicos	Amoxicilina + Ac. Clavulónico	30 + 15
Betalactámicos Cefalosporínicos	Ceftiofur	30
	Cefquinome	30
Tetraciclinas	Doxiciclina	80
	Tetraciclina	30
Aminoglucósidos	Gentamicina	10
Macrólidos	Eritromicina	78
	Tilosina	150
Quinolonas	Enrofloxacin	10
Lincosamida + Aminoglucósido	Lincomicina + Espectinomycin	15 + 200
Fenicoles	Florfenicol	30

IV.15.2. Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de *P. multocida*

La susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *P. multocida* fue determinada utilizando la técnica de medición de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante la técnica de microdilución en caldo, utilizando el Sistema estandarizado Sensititre® BOPO6F (Trek Diagnostic, Inglaterra). El sistema Sensititre es un preparado comercial de microtitulación en paneles de 96 pocillos tapizados con antimicrobianos de uso veterinario recomendados para las especies bovina y porcina. Los antimicrobianos utilizados y sus respectivos rangos de dilución se describen en la Tabla 23.

Los inóculos fueron preparados a partir de un crecimiento bacteriano de 24 horas de incubación en una placa de agar Columbia sangre, se prepararon suspensiones de cada uno de los aislados en tubos de agua desmineralizada estéril ajustados a un estándar 0,5 en la escala de McFarland, se realizó una dilución de dicha suspensión de 1:200 en caldo Mueller-Hinton suministrado por el fabricante. Cincuenta microlitros del inóculo

ajustado se depositaron en cada pocillo de la microplaca. Los paneles fueron sellados con el precinto adhesivo suministrado y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Tabla 23: Lista de antibióticos evaluados en el análisis de CMI

Antibiótico	Abreviatura	Concentración (ug/ml)
Ceftiofur	XNL	0,25 a 8
Tiamulina	TIA	0,5 a 32
Clortetraciclina	CTET	0,5 a 8
Gentamicina	GEN	1 a 16
Florfenicol	FFN	0,25 a 8
Oxitetraciclina	OXY	0,5 a 8
Penicilina	PEN	0,12 a 8
Ampicilina	AMP	0,25 a 16
Danofloxacin	DANO	0,12 a 1
Sulfadimetoxina	SDM	256
Neomicina	NEO	4 a 32
Sulfametoxazol-trimetoprim	SXT	2 /38
Espectinomicina	SPE	8 a 64
Tartrato de tilosina	TYLT	5 a 32
Tulatromicina	TUL	1 a 64
Tilmicosina	TIL	4 a 64
Clindamicina	CLI	0,25 a 16
Enrofloxacin	ENRO	0,12 a 2

Los valores utilizados como puntos de corte para la lectura de las placas, para los antibióticos ceftiofur, tiamulina, clortetraciclina, gentamicina, florfenicol, oxitetraciclina, penicilina, ampicilina, danofloxacin, sulfadimetoxina, neomicina, sulfametoxazol-trimetoprim, espectinomicina, tilmicosina y enrofloxacin, fueron los recomendados por el CLSI (CLSI, 2008). Para tulatromicina, el valor de punto de corte utilizado fue el previamente reportado por Godinho (2008) para otros patógenos respiratorios aislados de las especies bovina y porcina (Godinho, 2008). Para la clindamicina, y el tartrato de tilosina, no hay valores de punto de corte disponibles para microorganismos gram-negativos, sin embargo, los valores recomendados para

otros patógenos veterinarios gram positivos se utilizaron en este estudio. La CMI se define como la concentración más baja que inhibe el crecimiento de la bacteria.

Se registraron los rangos de susceptibilidad de cada uno de los aislamientos. Cepas de referencia de *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC29213 fueron utilizados como organismos de control de calidad en todas las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de resistencia antibiótica.

IV.16. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de pulmón y linfonódulos mediastínicos fueron procesadas en el Servicio de Histopatología y Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid. Las muestras fueron fijadas en formol al 10%, se realizaron los cortes histopatológicos y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E), luego se observaron al microscopio.

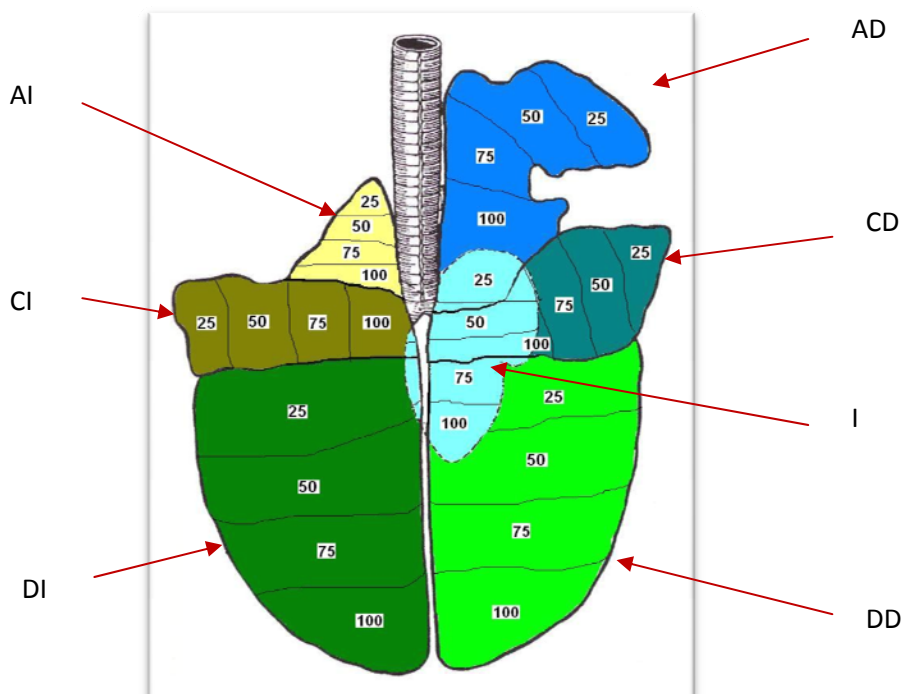
IV. 17. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE CONSOLIDACIÓN PULMONAR

Durante la siembra de las muestras, se procedió a inspeccionar los pulmones, para lo cual se preparó una ficha donde se anotó el área del lóbulo pulmonar afectado. Se estandarizó una técnica de evaluación de los pulmones utilizando el modelo descrito por Piffer y Brito (1991) en cerdos. Para ello, los lóbulos pulmonares fueron identificados con sus respectivas abreviaturas, apical derecho (AD), apical izquierdo (AI), cardíaco derecho (CD), cardíaco izquierdo (CI), diafragmático derecho (DD), diafragmático izquierdo (DI) e intermedio (I) (Figura 4).

A cada lóbulo se le asignó un valor, que se obtuvo en base al peso de cada uno de ellos y en relación al total del peso pulmonar. Se pesaron 3 pulmones de corderos sanos, se anotó el peso de cada uno de ellos y se halló el promedio del peso para los 3 pulmones. Posteriormente, se seccionó cada lóbulo por la fisura de unión existente entre ellos y se determinó el peso de cada uno de los lóbulos; con los datos de los

pesos de todos los pulmones, se obtuvo un promedio de peso para cada lóbulo y se halló el peso relativo de cada uno en relación al total del peso del pulmón (Tabla 24).

Figura 4: Esquema de pulmón que indica el porcentaje atribuible a cada lóbulo.



AI= Apical izquierdo, CI= Cardíaco izquierdo, DI= Diafragmático izquierdo, AD= Apical derecho, CD= Cardíaco derecho, DD= Diafragmático derecho, I= Intermedio.

Tabla 24: Peso promedio de cada lóbulo en relación al volumen total del pulmón

Lóbulo Pulmonar	Peso relativo
Apical derecho	0,11
Cardíaco derecho	0,1
Diafragmático derecho	0,35
Apical izquierdo	0,07
Cardíaco Izquierdo	0,06
Diafragmático izquierdo	0,27
Intermedio	0,04

En el modelo elaborado para los cerdos, se le otorga una puntuación del 0 al 4 de acuerdo al porcentaje de consolidación pulmonar encontrado en cada lóbulo (Tabla 25); cada puntuación tiene un valor asignado a cada lóbulo pulmonar en relación a su peso (Tabla 26). De acuerdo a esto, se obtiene una sumatoria de los valores asignados a cada lóbulo pulmonar y el valor total dado expresado en porcentaje se ubica dentro de una categoría de consolidación (Tabla 27).

Tabla 25: Puntuación según la extensión del área de consolidación pulmonar en cada lóbulo

Puntuación	Extensión de la lesión de consolidación pulmonar en cada lóbulo (% del área pulmonar)
0	Sin consolidación pulmonar
1	1 al 25%
2	26 al 50%
3	51 al 75%
4	76 al 100%

Fuente: Piffer y Brito (1991).

Tabla 26: Área de consolidación de lóbulos pulmonares, considerándose el área consolidada y el peso relativo del lóbulo en relación al parénquima pulmonar

Puntuación (según Tab.1)	Área de consolidación (%) / lóbulo pulmonar						
	AD	CD	DD	AI	CI	DI	I
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1,38	1,25	4,38	0,88	0,75	3,38	0,50
2	4,13	3,75	13,13	2,63	2,25	10,13	1,50
3	6,93	6,30	22,05	4,41	3,78	17,01	2,52
4	9,68	8,80	30,80	6,16	5,28	23,76	3,52

Tabla 27: Puntuación relativa a las categorías de volumen de consolidación pulmonar

Categorías	Porcentaje de volumen de consolidación (%)
0	0
1	0,1 a 20
2	20,1 a 40
3	40,1 a 60
4	60,1 a 80
5	80,1 a 100

IV.18. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos fueron analizados utilizando los programas estadísticos SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) y Epi-Info versión 3.5.1. Para establecer las asociaciones entre las variables se utilizó las pruebas de Chi Cuadrado y el Test exacto de Fisher. Además se determinó el OR e intervalos de confianza al 95%. También se realizó un Análisis Factorial o Análisis cluster y en base a las coordenadas factoriales resultantes se agruparon los animales en “*clusters*”, para ello se utilizaron los programas SPAD 5.6 y SAS 9.1.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mannheimia haemolytica, *Pasteurella multocida* y *Bibersteinia trehalosi* son considerados los miembros más importantes de la familia *Pasteurellaceae* que ocasionan grandes pérdidas a la industria ganadera. Estas especies son parte de la microbiota normal de la nasofaringe de los rumiantes y son capaces de causar enfermedad cuando los mecanismos de defensa del organismo se encuentran alterados. El objetivo del presente trabajo fue la tipificación fenotípica y genotípica de aislados de *M. haemolytica* y *P. multocida* asociados a la presencia de lesiones neumónicas en corderos de cebo sacrificados en matadero.

V.1. MUESTREO

En total se obtuvieron 263 pulmones de corderos, de entre 4 y 5 meses de edad, durante las ocho visitas realizadas a tres mataderos de la Comunidad de Madrid. El total de muestras por matadero y la procedencia de las mismas se describen en la Tabla 28. Las visitas realizadas a los mataderos se realizaron durante los meses de invierno y primavera de los años 2008 y 2009.

Los tres mataderos visitados recibían corderos provenientes de explotaciones de ovinos de las Comunidades Autónomas de Madrid y Extremadura. Cabe resaltar, que en la Comunidad Autónoma de Extremadura se concentra la mayor cantidad de cabezas de ganado ovino de todo el territorio español (MARM, 2009).

En algunos casos, no se logró obtener el tamaño de muestra previsto por muestreo (30 pulmones) debido al manejo del matadero. Sin embargo, en la mayoría de los muestreos el tamaño de muestra sobrepasó los 30 pulmones. En relación a la proporción de pulmones con y sin lesiones neumónicas, en la mayoría de las visitas la frecuencia de pulmones que presentaban lesiones macroscópicas compatibles con neumonía fue alta, dificultando la recogida de muestras de pulmones sin lesiones neumónicas. En total se recogieron 263 pulmones, el 57,4% (151/263) con lesiones neumónicas y el 42,6% (112/263) sin lesiones neumónicas, aunque la proporción fue desigual variando en cada muestreo (Tabla 28).

Tabla 28: Procedencia de las muestras, fecha de muestreo y numero de muestras.

Nº muestreo	Nº de pulmones recogidos			Matadero	Fecha	Época del año	Nº pulmones	Provincia	Municipio
	Total (N=263)	Con lesiones neumónicas (N=151)	Sin lesiones neumónicas (N=112)						
1	45	9	36	Madrid Norte	18/02/2008	Invierno	45	Badajoz	
2	52	27	25	Madrid Norte	02/04/2008	Primavera	52	Badajoz	
3	30	14	16	Colmenar Viejo	20/05/2008	Primavera	16	Cáceres	Monroy
							14	Cáceres	Torrejón el Rubio
4	30	20	10	Colmenar Viejo	18/06/2008	Primavera	30	Cáceres	Serradilla
5	31	24	7	Colmenar Viejo	17/02/2009	Invierno	15	Cáceres	Monroy, Zurita
							16	Cáceres	Aldea Centenera, Jaraicejo
6	31	16	15	Colmenar Viejo	03/03/2009	Invierno	31	Cáceres	Trujillo, Monroy
7	40	37	3	Getafe	11/03/2009	Invierno	20	Madrid	Fuenlabrada
							20	Madrid	Fuenlabrada
8	4	4	0	Colmenar viejo	16/11/2009	Otoño	4	Cáceres	

V.2. LESIONES MACROSCÓPICAS DE LOS PULMONES

Las lesiones neumónicas típicas de la pasteurelosis neumónica son las de una bronconeumonía, caracterizada macroscópicamente por la consolidación de los lóbulos pulmonares cráneoventrales (López, 2007). Las lesiones neumónicas en nuestro estudio se definieron por la observación de lesiones macroscópicas de consolidación cráneoventral (Figura 5). El término consolidación se utiliza para describir un pulmón de textura más firme o dura de lo normal y relleno de exudado que lo hace más pesado (López, 2007). El lóbulo más frecuentemente afectado fue el lóbulo craneal derecho extendiéndose caudalmente dependiendo de la intensidad de las lesiones (Figura 6). En algunos pulmones se observó la presencia abscesos y de exudado purulento en los bronquios de la zona consolidada (Figura 7). La presencia de edema también fue una característica común (Figura 8).

Las lesiones observadas en los pulmones analizados son similares a las descritas por otros autores en la pasteurelosis neumónica (Thomson, 1974; Friend *et al.*, 1977; Gibbs *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1997; Lopez, 2001; Oruc, 2006; Sheehan *et al.*, 2007). Estos autores describen una bronconeumonía fibrinosa, que llega a ser fibrinopurulenta en casos de neumonías subagudas y crónicas, y que pueden incluir abscesos y adherencias pleurales fibrinosas. El lóbulo afectado frecuentemente es el lóbulo craneal. La predilección por el lóbulo craneal derecho de este tipo de neumonía ya ha sido reportado por otros autores (Hazirolu *et al.*, 1996; Oruc, 2006; Sheehan *et al.*, 2007). En las muestras evaluadas en este estudio, la característica más común fue la afección del lóbulo apical derecho. Este hecho podría explicarse por la anatomía del pulmón de los rumiantes donde se observa la existencia de un “bronquio traqueal” (Sheehan *et al.*, 2007) que sale de la tráquea antes de la bifurcación de la misma en los dos bronquios principales. Este bronquio ingresa directamente en el lóbulo craneal. Los microorganismos al ser parte de la microbiota de la nasofaringe desciendan con frecuencia hacia el tracto respiratorio inferior albergándose en ésta zona que por ubicación es la primera en la que ingresan. Además, el patrón de flujo de aire que se presenta en esa zona puede favorecer el depósito de las partículas infectivas u obstaculizar la limpieza de la zona.



Figura 5: Pulmones de corderos sacrificados en matadero con lesiones neumónicas. Consolidación pulmonar cráneoventral.

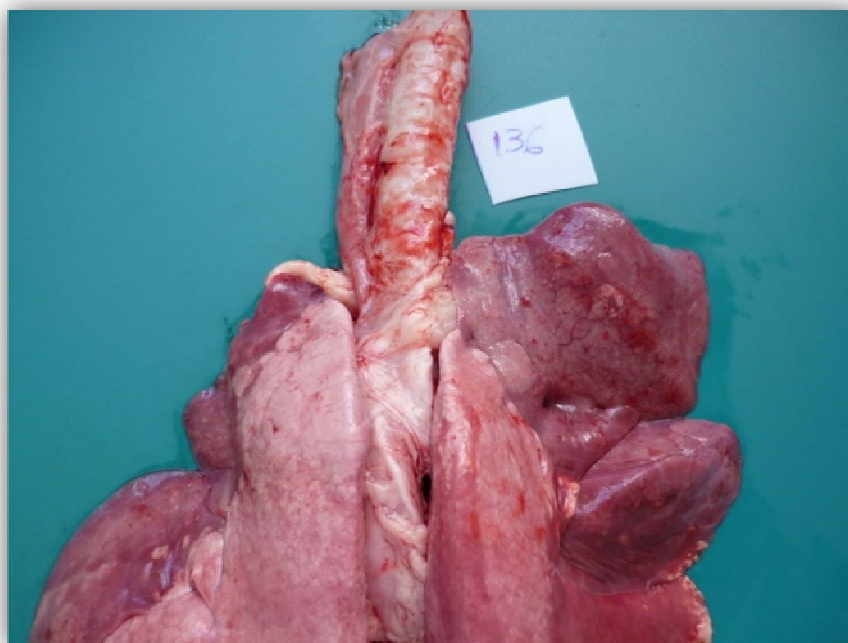


Figura 6: Detalle de la zona cráneoventral de un pulmón con lesiones neumónicas. La zona de consolidación se caracteriza por la consistencia más firme.



Figura 7: Presencia exudado purulento en bronquios en la zona de consolidación pulmonar.

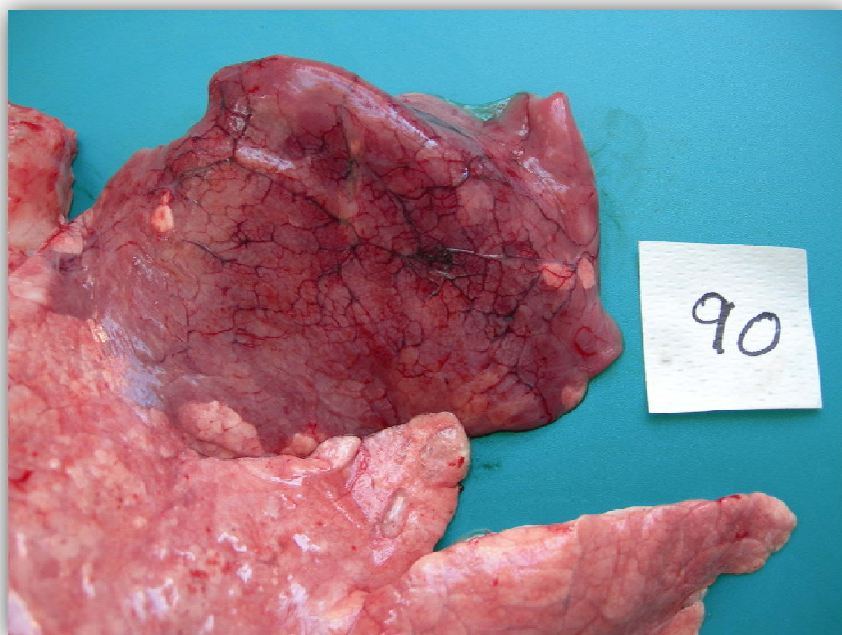


Figura 8: Presencia de edema interlobulillar.

En relación a la cuantificación de la severidad de la lesión pulmonar observada, se obtuvo una puntuación para cada pulmón siguiendo la metodología descrita (ver punto IV.17). En la Tabla 29 se muestran los resultados de la cuantificación del grado de consolidación pulmonar. El 42,6% de los pulmones correspondían a la categoría “0” de grado de consolidación, es decir, pulmones sin lesiones neumónicas macroscópicas. El 40,7% de los pulmones correspondían al grado de consolidación “1” que fue el grado de consolidación más frecuente entre los pulmones con lesiones. El 10% de los pulmones correspondía al grado de consolidación 2, el 4,9% grado de consolidación 3 y menos del uno por ciento tuvieron grado 4 y 5 de consolidación.

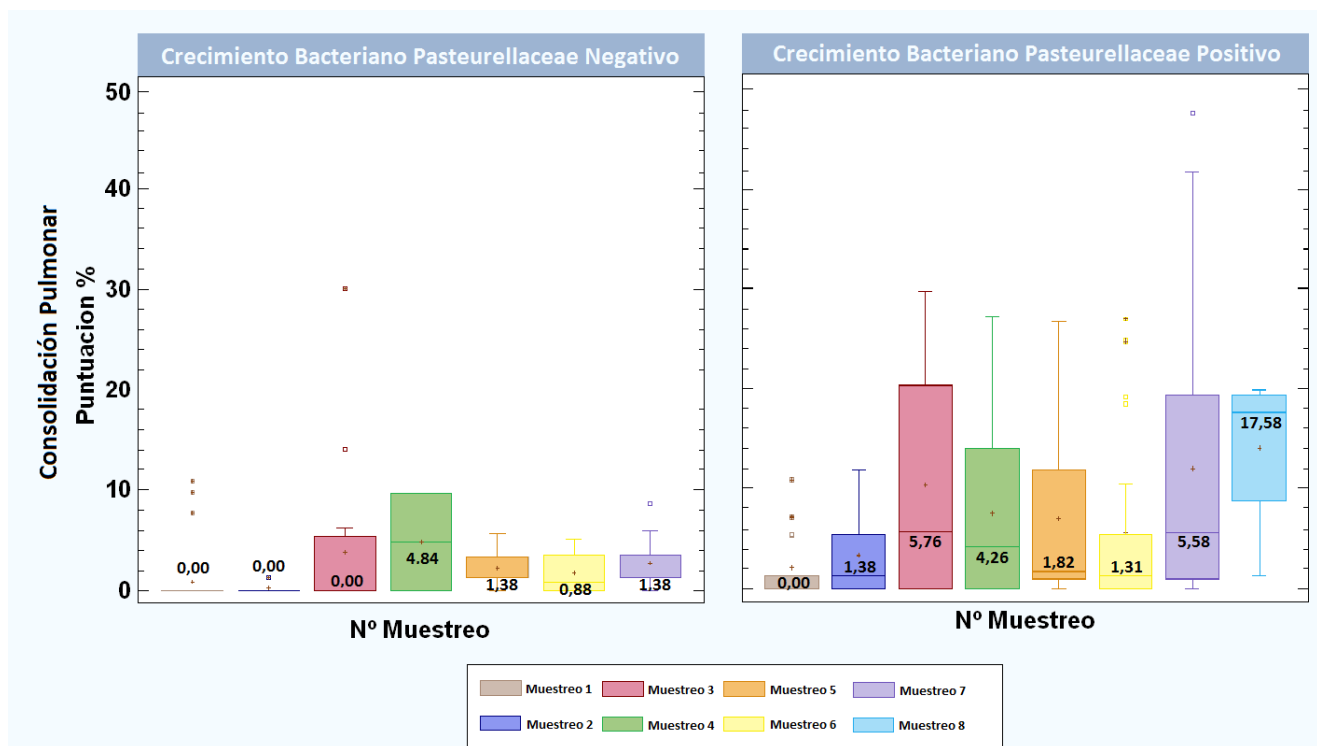
Tabla 29: Grado de consolidación pulmonar de los pulmones analizados.

Grado de consolidación pulmonar	Volumen pulmonar consolidado (%)	Pulmones	
		Número	%
0	(0)	112	42,6
1	(0,1 a 20)	107	40,7
2	(20,1 a 40)	27	10,3
3	(40,1 a 60)	13	4,9
4	(60,1 a 80)	2	0,8
5	(80,1 a 100)	2	0,8
Total		263	100

En la Figura 9 se muestran las puntuaciones de consolidación pulmonar obtenidos para cada pulmón y su distribución de acuerdo al muestreo realizado y al crecimiento bacteriano de la familia *Pasteurellaceae*. En los pulmones donde se aisló algún miembro de la familia *Pasteurellaceae* se observaron medianas de puntuación de consolidación pulmonar más altas en comparación con los pulmones donde no se aislaron. Los muestreos 3 y 7 fueron los que presentaron mayores porcentajes de consolidación pulmonar.

Es difícil comparar el grado de lesión neumónica en pulmones de cordero entre estudios diferentes porque las técnicas para anotar el grado de extensión de las lesiones varían de unos a otros. Generalmente se clasifica el grado de lesión en función de la extensión del área pulmonar afectada (Goodwin *et al.*, 2004).

Figura 9: Distribución de las puntuaciones de consolidación pulmonar en cada muestreo en relación al aislamiento de bacterias de la familia *Pasteurellaceae*.



*Números en cada “caja” representan el valor de la mediana de los datos de puntuación de consolidación pulmonar para cada muestreo

Goodwin *et al.* (2004) en un estudio en matadero clasificaron los pulmones de cordero sacrificados en tres categorías: 1) no neumonía, 2) ligera neumonía (<10% de la superficie pulmonar afectada) y 3) moderada a severa ($\geq 10\%$ de superficie pulmonar afectada).

En nuestro estudio hemos adaptado el sistema de puntuación descrito en porcino (Morrison *et al.*, 1985; Piffer y Brito, 1991) para determinar el grado de consolidación observada en los pulmones de cordero estudiados. El sistema utilizado en este estudio permite estimar el total del volumen pulmonar consolidado y es, por tanto, un indicador del grado de disfunción pulmonar.

Diversos autores han descrito la asociación entre la presencia de lesiones neumónicas al sacrificio y la disminución en los parámetros productivos de los corderos durante el cebo. Procesos neumónicos moderados o severos se asociaron a una reducción en la ganancia de peso de 0,45 kg por cordero en promedio (Kirton *et al.*, 1976; Goodwin *et al.*, 2004; Daniel *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Luzon *et al.*, (1999) se encontró que la presencia de lesiones no siempre se asocia a índices productivos disminuidos, estando más bien asociado a la intensidad de las lesiones neumónicas

En nuestro análisis de la severidad de las lesiones pulmonares, observamos que la mayoría de los pulmones analizados tenían un grado de consolidación pulmonar de “1” (0 -20% de volumen pulmonar consolidado), lo que corresponde con lo observado por otros autores (Goodwin *et al.*, 2004) donde la mayoría de los corderos analizados presentaban lesiones pequeñas o poco severas.

Resultó difícil obtener igual cantidad de muestras de corderos con lesiones neumónicas y sin lesiones neumónicas, independientemente de la procedencia, debido a que la mayoría de los corderos sacrificados en los mataderos muestreados presentaron algún tipo de lesión neumónica observable después del sacrificio. Esto podría ser indicativo de la importancia de la neumonía en la crianza ovina en España o, al menos, en las zonas de procedencia de los corderos sacrificados en los tres mataderos del estudio, las Comunidades Autónomas de Extremadura y Madrid.

Es conocido que la neumonía puede reducir la ganancia de peso en los corderos, debido a la demanda metabólica que produce en los animales para reparar el daño del

tejido pulmonar. Además, la prolongada estimulación del sistema inmune puede causar una respuesta parecida al estrés e inhibir el crecimiento de las ovejas (Kolb *et al.*, 2000 citado por Goodwin *et al.*, 2004).

V.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Algunos de los pulmones en los que se observaron lesiones neumónicas macroscópicas de cada muestreo se seleccionaron para el análisis histológico de las lesiones. Histológicamente, los pulmones con lesiones neumónicas presentaron lesiones compatibles con una bronconeumonía supurativa crónica. Los alveolos, bronquiolos y pequeños bronquios presentan exudado inflamatorio que progresivamente oblitera el espacio del aire y como consecuencia impide el intercambio gaseoso (Figura 10).

Generalmente se describe la neumonía originada por *M. haemolytica* como una bronconeumonía fibrinosa o fibrinosupurativa, a veces necrotizante, mientras que la neumonía producida por *P. multocida* se describe como bronconeumonía supurativa (López, 2007). En realidad el tipo de bronconeumonía, supurativa o fibrinosa, viene determinado por el grado de severidad de las lesiones vasculares (López, 2007). Histológicamente, la bronconeumonía fibrinosa se ha observado también en corderos experimentalmente infectados con *P. multocida* (Odugbo *et al.*, 2006).

En este estudio, las lesiones histológicas de las zonas de consolidación en las muestras estudiadas se correspondieron mayoritariamente con una bronconeumonía supurativa crónica, con abundancia de exudado en la luz de bronquiolos, bronquios y alveolos con presencia de células mononucleares. En la bronconeumonía supurativa crónica también es un componente importante la hiperplasia de las células caliciformes (Figura 10). El exudado varía de mucopurulento a mucoide dependiendo de la porción de pus y mucus siendo más mucoide cuanto más crónico. También es frecuente la hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) alrededor de las paredes bronquiales (Figura 11). Es la reacción normal del tejido linfoide a la infección.

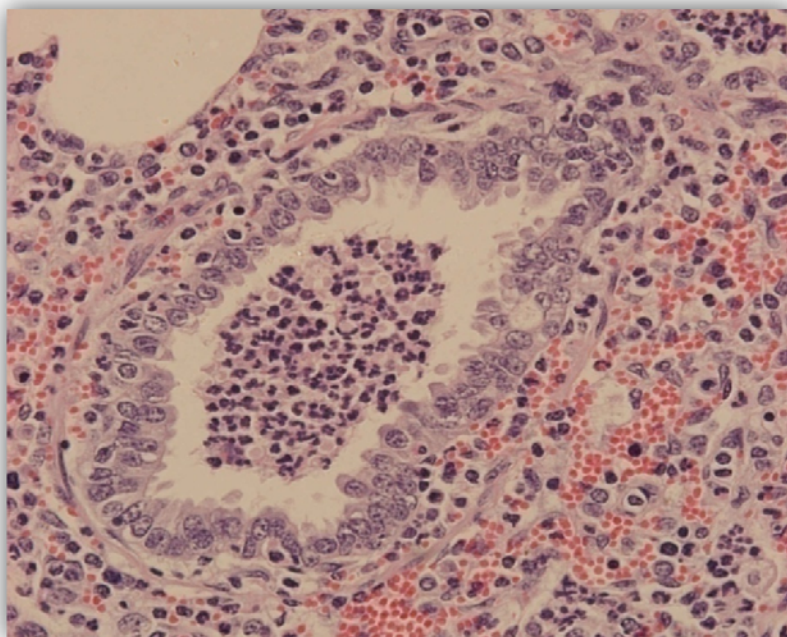


Figura 10: Bronconeumonía supurativa (H&E). 20X. Exudado en la luz bronquiolar con predominancia de PMN y macrófagos. También pueden observarse detritus celulares, eritrocitos extravasados y edema. Hiperplasia de células caliciformes.

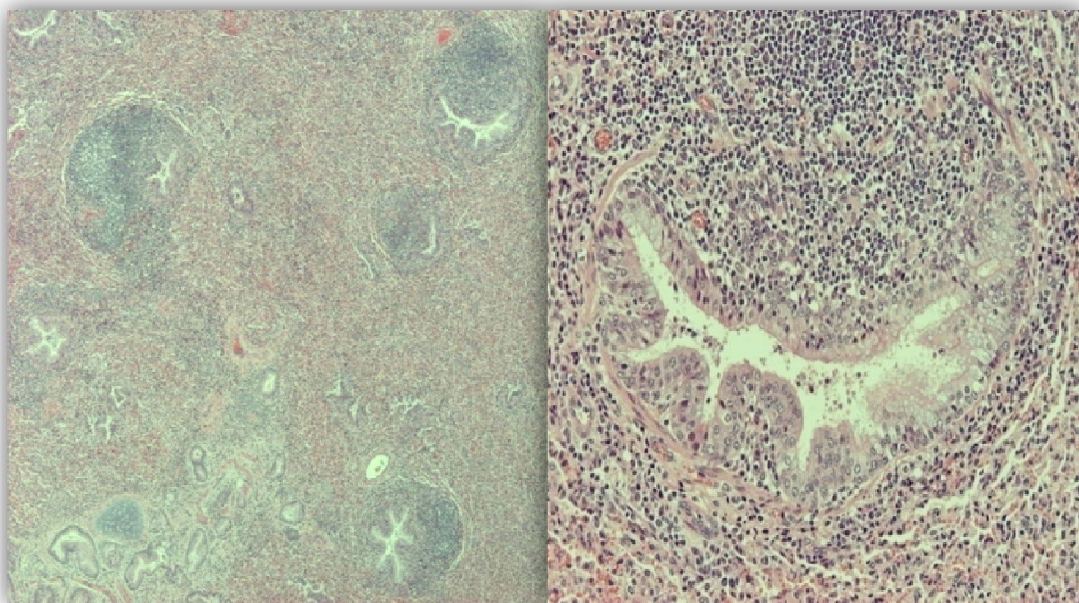


Figura 11: Hiperplasia de tejido linfoide peribronquiolar (H&E). A). 2X. Activación de tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), abundante infiltración de linfocitos en septos interalveolares. B). Detalle (10X). Presencia de linfocitos inmaduros infiltrados en el tejido ocluyendo la luz del bronquiolo. Esta imagen es típica de procesos crónicos.

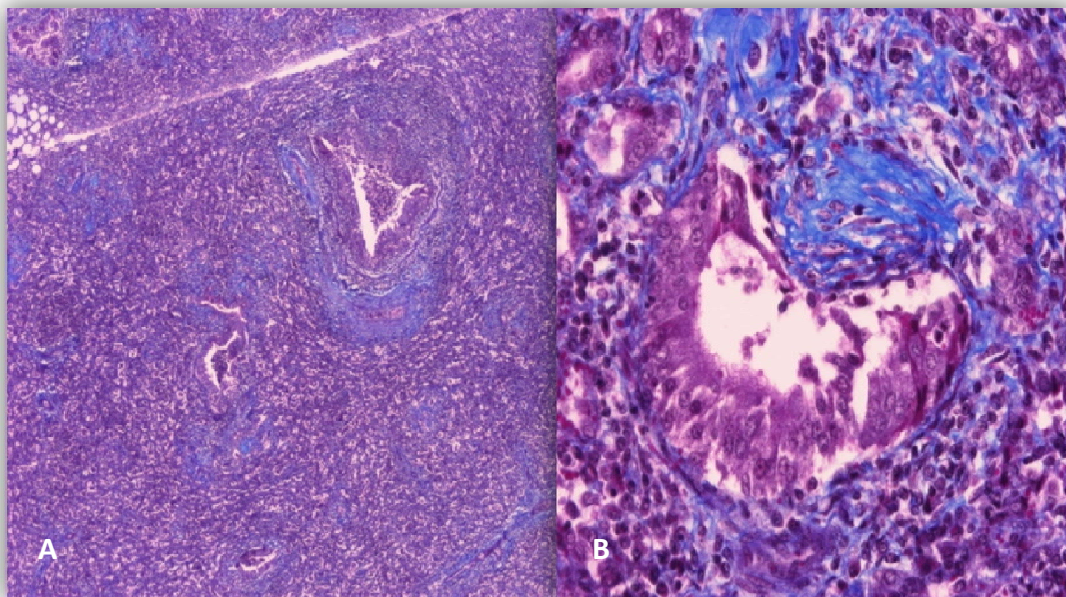


Figura 12: Bronquiolitis obliterante (tinción de Masson). A) 2X. Observesé la abundante infiltración de tejido conectivo (teñido de azul) en el parenquima pulmonar, lo que indica la cronicidad de la lesión. B) 20X. Fibroplasia de un bronquiolo, detalle de la proliferación de tejido conectivo alrededor de bronquiolos que oblitera la luz del bronquiolo.

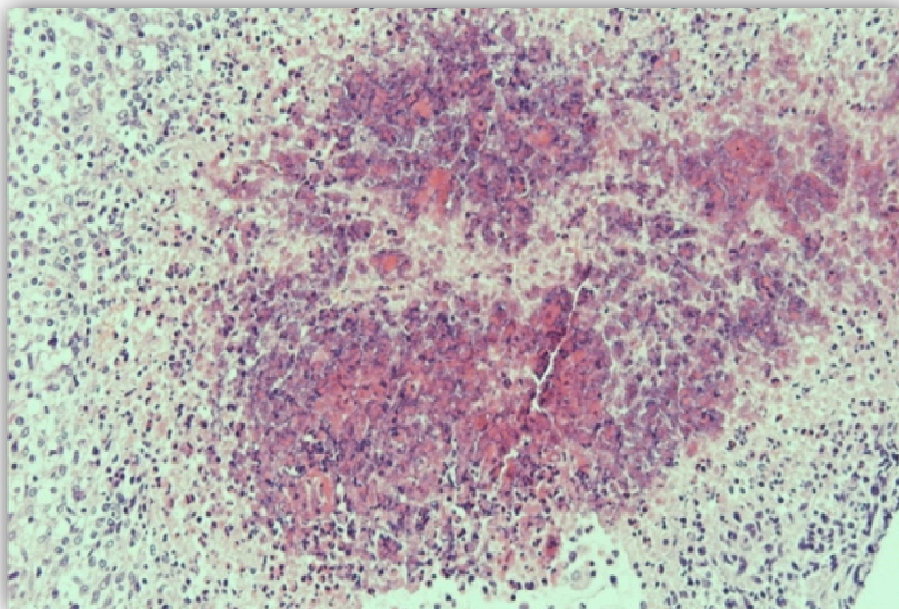


Figura 13: Pulmón. 40X (H&E). Foco de necrosis en tejido pulmonar rodeado de una abundante infiltración de células de tipo inflamatorio. Pérdida de la estructura normal del tejido, los septos interalveolares están rotos y distendidos.

No se observó microscópicamente la imagen de la típica bronconeumonía fibrinosa característica de la pasteurelosis neumónica aguda. Es difícil que los animales sacrificados en matadero presenten lesiones compatibles con un proceso febril agudo y es más lógico pensar que las lesiones detectadas se corresponden con procesos crónicos y secuelas de los procesos inflamatorios agudos. A diferencia de la bronconeumonía supurativa, la fibrinosa raramente se resuelve completamente y deja secuelas en forma de fibrosis y adherencias pleurales (López, 2007). La secuela más común es la bronquiolitis obliterated, en la que el exudado organizado aparece adherido al lumen bronquiolar. Lesiones correspondientes a distintos grados de fibrosis y a bronquiolitis obliterated sí se observaron en algunas muestras (Figura 12).

La lesión considerada más característica de *M. haemolytica* es una necrosis de coagulación rodeado por una capa densa de leucocitos. Se observó en algunas muestras la presencia de focos de necrosis dentro del tejido rodeado de una abundante infiltración de células de tipo inflamatorias como polimorfonucleares y macrófagos (Figura 13). Estas lesiones han sido observadas también por otros autores (Oruc, 2006). Esta característica aunque no es exclusiva de infecciones por *M. haemolytica*, puede explicarse por la presencia de la leucotoxina en cepas del género *Mannheimia*. Esta proteína es una toxina citolítica que afecta principalmente a los leucocitos de rumiantes. Cuando es liberada la leucotoxina estimula la proliferación de PMN y la activación de macrófagos, con la consecuente liberación de citoquinas proinflamatorias, y la producción de radicales libres que aumentan el daño ocasionado al epitelio pulmonar, resultando en la acumulación de fluidos y fibrina en los espacios interalveolares (Biberstein y Hirsh, 1999; Lopez, 2001).

V.4. CRECIMIENTO BACTERIANO

La siembra en medios de cultivo reveló que un 64,6% (170/263) de los pulmones fue positivo al crecimiento de bacterias sospechosas de ser *Pasteurellaceae*. Las colonias sospechosas de pertenecer a la Familia *Pasteurellaceae* en función de las características de crecimiento en agar sangre Columbia, la tinción de Gram y las

pruebas bioquímicas de la catalasa y oxidasa, se clasificaron en tres tipos morfológicos:

1. **Tipo TH (Translúcidas Hemolíticas):** las colonias de aspecto translúcido, de tamaño mediano (alrededor de 3 mm) y que produjeron hemólisis total en el agar sangre Columbia (Figura 14), cocobacilos gram negativos y positivas a las pruebas de la catalasa y oxidasa. Se tomaron como colonias sospechosas de especies de *Mannheimia* y/o *Bibersteinia* (Complejo *Mannheimia-Bibersteinia*). Cuando fue posible se seleccionaron cuatro colonias por pulmón.

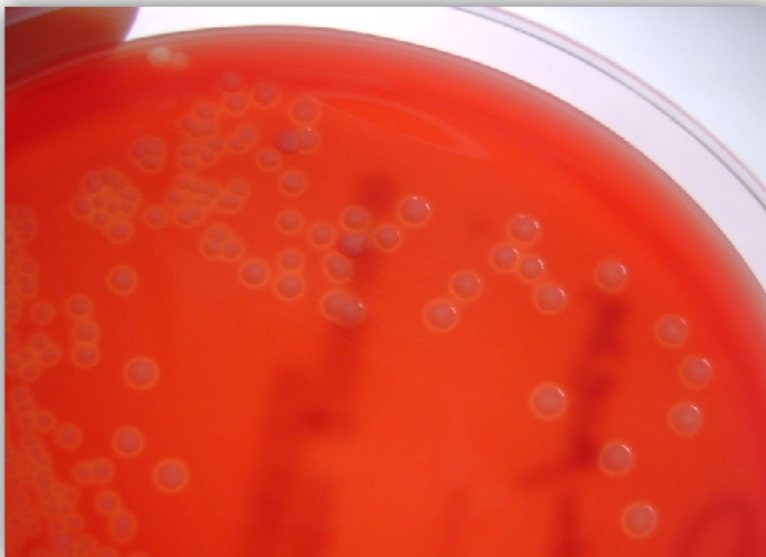


Figura 14: Crecimiento bacteriano de colonias de *M. haemolytica* en agar sangre Columbia: colonias translúcidas productoras de hemólisis total.

2. **Tipo BNH (Blanquecinas No Hemolíticas):** las colonias que se observaron de color blanquecino, de aspecto mucoso, de tamaño mediano (alrededor de 3 mm), no produjeron hemólisis en el agar sangre Columbia (Figura 15), bacilos o cocobacilos gram negativos, positivas a las pruebas catalasa y oxidasa, se tomaron como colonias sospechosas de *P. multocida*. Se tomó una colonia por muestra, excepto, en los pulmones donde se observaron colonias con variaciones morfológicas dentro de esta categoría.



Figura 15: Crecimiento bacteriano de colonias de *P. multocida* en agar sangre Columbia: colonias blanquecinas no hemolíticas de olor característico.

3. **Tipo TNH (Translúcidas No hemolíticas):** las colonias que se observaron translúcidas, no hemolíticas, bacilos gram negativos, catalasa positivos y oxidasa positivos, fueron clasificadas como sospechosas de otros miembros de la Familia *Pasteurellaceae*.

Se seleccionaron un total de 603 colonias pertenecientes a la Familia *Pasteurellaceae* de un total de 170 pulmones (Tabla 30). El 77,95% (470/603) de las colonias se clasificó como sospechosas de ser parte del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia* (Complejo *M-B*) (colonias tipo TH), el 15,75% (95/603) como sospechosas de ser parte del género *Pasteurella* (colonias tipo BNH) y el 6,30% (38/603) como sospechosas de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* (colonias tipo TNH).

El aislamiento de bacterias potencialmente patógenas en muestras de animales aparentemente sanos ha sido reportado en varias especies animales. Pocos reportes se han publicado sobre la flora normal del tracto respiratorio inferior de los corderos. En rumiantes, especialmente bovinos, se han llegado a aislar bacterias de hasta el 52% de muestras de pulmones, siendo que alrededor del 83% de las bacterias aisladas

fueron identificadas como *Pasteurellaceae* (Viso *et al.*, 1982 citado por (Angen *et al.*, 2009). En ovinos, se ha aislado *M. haemolytica* en un rango entre 8,9% y 96,2% en hisopos de la cavidad nasal de animales sanos (Biberstein y Thompson, 1966; Biberstein *et al.*, 1970; Al-Tarazi y Dagnall, 1997). En casos de animales con signos de neumonía, tanto en bovinos como en ovinos, *M. haemolytica* y *P. multocida* se consideran los principales patógenos bacterianos involucrados en los procesos respiratorios (Ackermann y Brogden, 2000).

Tabla 30: Colonias de la Familia *Pasteurellaceae* aisladas de pulmones de corderos en matadero clasificadas en función de las características de crecimiento

Tipo de Colonia*	Nº de Colonias aisladas		Nº de pulmones de los que procedían según nº colonias				Total
	Nº	%	1 col.	2 col.	3 col.	≥4 col.	
TH (posible <i>Mannheimia-Bibersteinia</i>)	470	77,95	19	24	10	89	141
BNH (posible <i>Pasteurella multocida</i>)	95	15,75	77	6	2	0	85
TNH (posible otras <i>Pasteurellaceae</i>)	38	6,30	38	0	0	0	38
TOTAL	603	100					170

* Todas las colonias fueron bacilos o cocobacilos gram negativos, catalasa y oxidasa positivas.

Las variaciones encontradas en la frecuencia de aislamiento con otros estudios probablemente se deba a diversos factores como las diferencias en las técnicas de aislamiento, la mala identificación y diferenciación bioquímica y la variación estacional (Poulsen *et al.*, 2006).

En nuestro estudio, pudimos observar que el método de siembra de la muestra influye en el aislamiento o no de bacterias de la familia *Pasteurellaceae*. Cuando después de obtener el trozo de muestra del pulmón se realizó la impronta en el medio de cultivo, las probabilidades de aislar el microorganismo fueron menores que cuando se frotó presionando ligeramente el trozo de muestra sobre el medio de cultivo. Esto nos hace sospechar que las variaciones en factores externos a la presencia del microorganismo en la muestra, como el método de siembra, influyen positiva o negativamente en su detección.

V.5. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

V.5.1. Identificación Bioquímica (DIATABS®)

Se seleccionaron 257 aislados TH sospechosos de ser parte del Complejo *M-B*, de un total de 470 obtenidos, para su identificación mediante pruebas bioquímicas. Se seleccionaron dos colonias por pulmón excepto en los pulmones en los que se obtuvo una única colonia TH. En la Tabla 31 se muestran los resultados de la identificación. De los 257 aislados analizados 255 se identificaron como alguna especie del género *Mannheimia*: 236 *M. haemolytica*, 11 *M. glucosida*, 2 *M. varigena* y 6 aislados en los que no se pudo determinar la especie se clasificaron como *Mannheimia sp.* y solo un aislado se identificó como *Bibersteinia trehalosi*. Un aislado fue identificado como otra bacteria que no formaba parte del complejo *M-B*. Se analizaron también por DIATABS® 16 aislados TNH, que a pesar de ser no hemolíticos, el sistema VITEK® los identificó como *M. haemolytica* (Tabla 31). De los 16 aislados no hemolíticos 7 se identificaron como *M. ruminalis* y el resto se clasificó como *Mannheimia sp.*

Tabla 31: Resultados de la identificación mediante pruebas bioquímicas (DIATABS®) de los aislados catalasa y oxidasa positivos, hemolíticos (colonia TH) y no hemolíticos (colonias TNH).

Tipo colonias	Identificación bioquímica	Frecuencia	Porcentaje (%)
TH (n = 257)	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	1	0,4
	<i>Mannheimia glucosida</i>	11	4,3
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	236	91,8
	<i>Mannheimia sp.</i>	6	2,3
	<i>Mannheimia varigena</i>	2	0,8
	Otra bacteria	1	0,4
TNH (n = 16)	<i>Mannheimia ruminalis</i>	7	43,75%
	<i>Mannheimia sp.</i>	9	56,25%

En la Tabla 32 se muestra el resumen del análisis de las características bioquímicas de los 272 (256 TH y 16 TNH) aislados del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia* y las cepas patrón de cada especie de los géneros *Mannheimia* y *Bibersteinia*. Para la mayoría de las pruebas se obtuvieron respuestas variables, tanto en las cepas de campo como en las cepas patrón.

Los aislados identificados como *M. haemolytica* mostraron la máxima variabilidad en la prueba del sorbitol 59,5% (138/232) y D-xilosa 8,9% (19/232), lo que difiere de la mayoría de publicaciones donde se afirma que la mayoría de cepas de *M. haemolytica* son positivas a ambas pruebas (Tabla 32).

El porcentaje de positivos a las diferentes pruebas bioquímicas del género *M. haemolytica* evaluadas con las tabletas DIATABS® mostró una gran variabilidad respecto a los requerimientos metabólicos indicados en otras publicaciones (Barbour *et al.*, 1997; Angen *et al.*, 2002; Blackall *et al.*, 2002).

Tabla 32: Resumen de las características bioquímicas de los aislados identificados como parte del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia*^a y de las cepas patrón*.

Características bioquímicas	<i>M. haemolytica</i>		<i>M. glucosida</i>		<i>M. varigena</i>	<i>B. trehalosi</i>		<i>M. ruminalis</i>	<i>Mannheimia sp.</i>
	Patrón (4) ^b	Campo (236)	Patrón (2)	Campo (11)	Campo (2)	Patrón (3)	Campo (1)	(7)	(15)
Hemólisis	+	+	+	+	+	+	+	-	V [5]
Esculina	-	V[1]	+	V [5] ^c	-	+	-	-	V [4]
α-Fucosidasa (ONPF)	+	V[231]	+	V [8]	-	-	-	+	V [9]
β-Galactosidasa (ONPG)	V [2]	V [231]	+	+	+	-	+	+	V [14]
β-Glucosidasa (NPG)	-	-	+	+	-	+	-	-	V [5]
ODC	-	V[2]	-	V [5]	-	-	+	-	V [1]
Trealosa	-	-	-	V[1]	-	+	+	-	V [1]
L-Arabinosa	-	-	-	V [1]	+	-	-	-	V [2]
D-Xilosa	-	V [18]	-	V[7]	+	-	-	-	V [1]
Manosa	+	V [235]	+	+	+	+	+	+	V [10]
Ramnosa	-	-	-	-	+	V [1]	-	-	-
Manitol	V [3]	V [220]	V [1]	+	+	V [1]	+	+	V [7]
Sorbitol	V [1]	V [140]	-	V [5]	+	-	-	V [2]	V [3]
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*. Cepas patrón utilizadas como control de las tabletas DIATABS: A2 (PH278) Davies, A2 Fodor, A6 (PH376) Davies, A11 Davies, A11 Fodor, A17 Fodor, T3 (PH68) Davies, T15 Fodor, y T10 (PH252) Davies. ^a. Todos los aislados fueron cocobacilos gram negativos, catalasa positivos, oxidasa positivos, hemolíticos y solo algunos crecieron en agar Mac Conkey. ^b. Números dentro de paréntesis indican el número de cepas evaluadas. ^c. Números dentro de corchetes indican el número de cepas positivas a la prueba. V. Variable

El género *Mannheimia* abarca un grupo de bacterias considerado como heterogéneo tanto fenotípica como genéticamente. El uso de pruebas comerciales (API y RapID) para la identificación de *P. haemolytica* ha sido reportado anteriormente (Groom *et*

al., 1986; Salmon *et al.*, 1993). Sin embargo, estas investigaciones no consideran la heterogeneidad fenotípica y genotípica del complejo *P. haemolytica*. El sistema estandarizado de identificación API, considera en su base de datos a la antes denominada *P. haemolytica* que posteriormente se diversificó, por lo que la identificación no es útil para la nueva clasificación del género *Mannheimia*. El sistema estandarizado VITEK® tampoco da un resultado definitivo a nivel de especie, este solo considera dentro de su base de datos a la actual *Mannheimia haemolytica*, y tampoco discrimina entre esta y las otras especies del mismo género.

Posteriormente a la reclasificación del complejo *P. haemolytica* en el nuevo género *Mannheimia*, Angen *et al.* 2002, describieron un método de caracterización fenotípica utilizando las tabletas de diagnóstico DIATABS®, el cual fue útil para clasificar una colección de aislados de campo obtenidos en Dinamarca (Angen *et al.*, 2002). Las tabletas DIATABS® también han sido utilizadas por otros investigadores con el mismo objetivo mostrando resultados aceptables. Aunque, tiene como dificultad algunas variaciones observadas en función a la densidad del inóculo, si es ligeramente menos o más denso se pueden observar reacciones negativas que dificultan aún más el diagnóstico (Angen *et al.*, 2002).

En nuestro trabajo, hemos logrado identificar hasta el nivel de especie la mayoría de los aislados evaluados con este sistema. La mayoría de aislados de *M. haemolytica* fueron negativas a la D-xilosa, contrario a lo descrito para esta bacteria (Mutters *et al.*, 2005). Esto puede explicarse por lo encontrado por Angen *et al.* 2002, quienes utilizando el mismo método observaron que las pruebas de D-Xilosa, ODC y esculina varían en resultado de acuerdo a la densidad del inóculo, siendo que, si la densidad del inóculo varía de 3 a 5 pueden encontrarse resultados negativos.

Las instrucciones del fabricante indican que la densidad del inóculo para utilizar estas tabletas debe ser de 4 en la escala de McFarland, sin embargo, Angen *et al.* 2002, determinaron que la utilización de las tabletas DIATABS® resulta útil cuando la concentración del inóculo se ajusta a la densidad 10 de la escala de McFarland, y que la prueba de ODC es mejor realizarla con métodos convencionales (Angen *et al.*, 2002).

La capacidad de fermentar manosa por aislados de *Mannheimia* no está descrita en el Manual Bergey's (Mutters *et al.*, 2005). Alexander *et al.* 2008, describieron que los aislados de *M. haemolytica* tienen la capacidad de fermentar manosa (Alexander *et al.*, 2008), dato corroborado por nuestro estudio, donde todos nuestros aislados de *M. haemolytica*, excepto uno, fermentaron este carbohidrato. Sin embargo, en el estudio realizado por Blackall *et al.* 2007, se describe que los aislados del género *Mannheimia* no producen ácido a partir de D-manosa, lo contrario sucede con el género *Bibersteinia* que sí lo producen (Blackall *et al.*, 2007).

Angen *et al.* 2002, encontraron que el 100% de aislados de *M. haemolytica* fueron positivos a la prueba de la manosa (D-manosa) realizada con tabletas DIATABS® (Angen *et al.*, 2002). Aunque, un estudio realizado por ellos mismos detectó que todos los aislados de *Mannheimia* fueron negativos a la prueba de la D-manosa cuando se realizó la prueba utilizando el método tradicional en caldo, por lo que las diferencias en los resultados podrían estar relacionadas con el método que se utiliza para observar las reacciones (Angen *et al.*, 1997a).

La capacidad de crecer en Agar Mac Conkey también fue una característica variable en nuestro estudio. Un estudio realizado por Blackall *et al.* 2002, donde se fenotipificó aislados de especies de *Mannheimia* obtenidos de ovinos y bovinos, también encontró que ninguno de sus aislados fue capaz de crecer en agar Mac Conkey (Blackall *et al.*, 2002).

M. varigena puede ser tipificada en dos biovars en base al resultado de la prueba de descarboxilación de la ornitina. El biovar 1 es ODC positivo y es frecuentemente aislado de bovinos, mientras que el biovar 2 es ODC negativo y es frecuentemente aislado de porcinos, y ambos han sido asociados a neumonía (Angen *et al.*, 1999a). Llama la atención, que en nuestro estudios los dos únicos aislados de *M. varigena* hayan sido negativos a la prueba de la ODC, siendo clasificados dentro del biovar 2 (más frecuente en cerdos), en vez del biovar 1 que ya ha sido previamente aislado en otros rumiantes.

Las pequeñas variaciones encontradas en otras pruebas bioquímicas realizadas también han sido descritas por otros autores (Angen *et al.*, 1999a) y parecen ser parte de la diversidad existente dentro de este nuevo género.

Adicionalmente a las variaciones en las características fenotípicas observadas en nuestro estudio, hemos podido encontrar que existen variaciones en los resultados de las diversas características que definen al género *Mannheimia* en otros estudios. Es así que, en relación a la capacidad de la bacteria de fermentar arabinosa (característica que originalmente ayudaba a la clasificación de *P. haemolytica* en los biotipos A y T) la mayoría de publicaciones describe que todos los aislados de *M. haemolytica* son positivos, sin embargo se debe tomar en cuenta, el tipo de arabinosa que se evalúa, siendo que, todas las cepas de *M. haemolytica* son negativas a L-arabinosa (Angen *et al.*, 2002).

Por otro lado, Barbour *et al.* 1997, describen que el 100% de aislados fermentan arabinosa (pero no describe si es D o L-arabinosa) (Barbour *et al.*, 1997) y Blackall *et al.* 2002, describe 100% de cepas que no producen ácido de L y D –arabinosa (Blackall *et al.*, 2002). La capacidad de la bacteria para producir hemólisis también da resultados variables, según Barbour *et al.* 1997, algunas cepas de *M. haemolytica* pueden perder la capacidad de producir hemólisis en el tercer subcultivo (Barbour *et al.*, 1997).

La capacidad de hidrolizar glucósidos, como la esculina, también es una característica bioquímica variable en las especies de los géneros *Mannheimia* y *Bibersteinia*. Catry *et al.* (2004) describen resultados variables en la hidrólisis de este compuesto en aislados de *M. varigena* y *B. trehalosi* (Catry *et al.*, 2004).

Estas variaciones en los resultados de pruebas bioquímicas para identificar microorganismos del complejo *M-B* revelan que existe una gran diversidad fenotípica en estos géneros. Existen en el mercado diversas técnicas estandarizadas para identificar microorganismos, sin embargo ninguna de ellas nos da un resultado certero de la identificación específica de bacterias del Complejo *M-B*. A pesar de las variaciones encontradas, la utilización de DIATABS® (con las modificaciones en cuanto a la densidad del inóculo propuestas por Angen *et al.* 2002) como herramienta de diagnóstico y diferenciación de cepas del Complejo *M-B* es útil (Angen *et al.*, 2002).

V.5.2. Identificación Bioquímica por VITEK®

Los 133 aislados no hemolíticos (95 clasificados como BNH y 38 aislados clasificados como TNH), se identificaron con las tarjetas VITEK® 2GN. Los resultados de la identificación se resumen en la Tabla 33. De los aislados BNH, (blanquecinos no hemolíticos), el 63,16 % se identificaron como *P. multocida* y en el 20% se obtuvo una baja discriminación con el sistema VITEK®. En cuanto a las colonias TNH (translúcidas no hemolíticas), 47,36% se identificaron como *M. haemolytica* y tan solo el 23,68 % como *P. multocida*. En total se identificaron como *P. multocida* el 51,88 % de los aislados no hemolíticos (Tabla 33).

Tabla 33: Resultados de la identificación con el sistema VITEK® de aislados catalasa y oxidasa positivos no hemolíticos clasificados como colonias tipo BNH y TNH.

Identificación	BNH (n=95)		TNH (n=38)		TOTAL (N=133)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Pasteurella multocida</i>	60	63,16	9	23,68	69	51,88
<i>Pasteurella canis</i>	3	3,16	0	0,0	3	2,26
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	2,11	4	10,53	6	4,51
Baja discriminación	19	20,0	2	5,26	21	15,79
<i>Mannheimia haemolytica</i>	2	2,11	18	47,36	20	15,04
<i>Actinobacillus/Mannheimia</i>	0	0,0	1	2,63	1	0,75
Otras bacterias	5	5,26	2	5,26	7	5,26
No identificado	4	4,21	2	5,26	6	4,51

Estudios de caracterización fenotípica de aislados de *P. multocida* se han llevado a cabo a menudo, utilizando métodos convencionales o el sistema API. Sin embargo, la identificación de estos microorganismos utilizando este sistema ha demostrado ser poco confiable (Boot *et al.*, 2004; Vera Lizarazo *et al.*, 2008; García, 2009).

No existen muchos estudios en los que se utilice el sistema VITEK® como sistema de identificación de *P. multocida*. Las variaciones encontradas en la identificación de los aislados de *P. multocida*, se definen en función al resultado obtenido. Todos los aislados clasificados por el sistema VITEK® como de “baja discriminación” fueron aislados que el sistema no logro discriminar entre *P. multocida* y *P. canis*,

recomendando la utilización de pruebas bioquímicas auxiliares como la prueba de D-manitol para diferenciarlas.

V.6. IDENTIFICACIÓN POR PCR

V.6.1. Identificación por PCR de aislados del complejo *Mannheimia-Bibersteinia*.

Se seleccionaron para ser identificadas mediante la técnica de PCR múltiple descrita por Dassanayake *et al.* 2010, 488 aislados clasificados como miembros del complejo *Mannheimia-Bibersteinia*. Esta técnica amplifica una secuencia específica del gen *gcp* de *M. haemolytica* de 266 bp y una secuencia específica del gen *sodA* de *B. trehalosi* de 143 bp (Figura 16) (Dassanayake *et al.*, 2010). Cabe resaltar que se realizó una PCR con cepas patrón de *M. glucosida* observándose que en ésta bacteria también se detecta el gen *gcp* que sirve para identificar aislados de *M. haemolytica*. Esto indicaría una limitación de esta técnica para diferenciar entre ambos aislados.

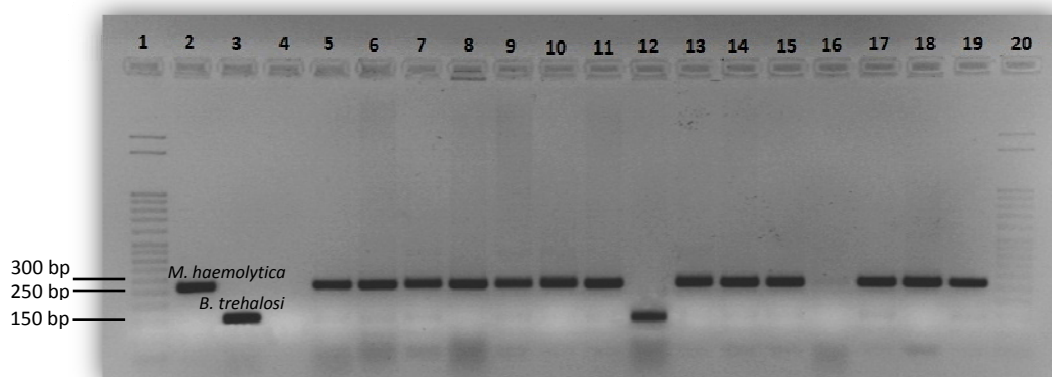


Figura 16: PCR de identificación de aislados del complejo *M-B*. Gel de agarosa al 1%. Línea 1: Marcador de peso molecular Sigma Aldrich (3000 bp), línea 2: Control Positivo de *M. haemolytica* (CECT924) 266bp, línea 3: control positivo de *B. trehalosi* (NCTC10370) 143bp, línea 4: control negativo, líneas 5-19: aislados sospechosos del complejo *M-B*.

Se identificaron como *M. haemolytica* el 99,8% (487/488) de los aislados (Tabla 34): todos los aislados pertenecientes a alguna especie del género *Mannheimia* y los 213 que se habían clasificado como colonias tipo TH en los que no se realizó la identificación bioquímica. El aislado identificado como *B. trehalosi* por las pruebas bioquímicas DIATABS® se confirmó como *B. trehalosi* por la PCR.

Actualmente se han diseñado técnicas de PCR convencional para la identificación de aislados de los géneros *Mannheimia* y *Bibersteinia* hasta nivel de especie (Alexander *et al.*, 2008; Angen *et al.*, 2009; Deressa *et al.*, 2010) y PCR en tiempo real (Guenther *et al.*, 2008). Sin embargo, no está comprobada la reproductibilidad y fiabilidad de ninguna de ellas hasta el punto de poder sustituir la identificación bioquímica de los aislados.

V.6.2. Identificación por PCR de *P. multocida*.

La prueba de PCR especie específica de identificación de *P. multocida* amplifica un fragmento de 460 bp del gen *kmt1* (Figura 17). La prueba se realizó a los 133 aislados no hemolíticos a los que se había realizado la identificación por VITEK® (Tabla 34). De los 133 aislados, 87 fueron positivos a la PCR.

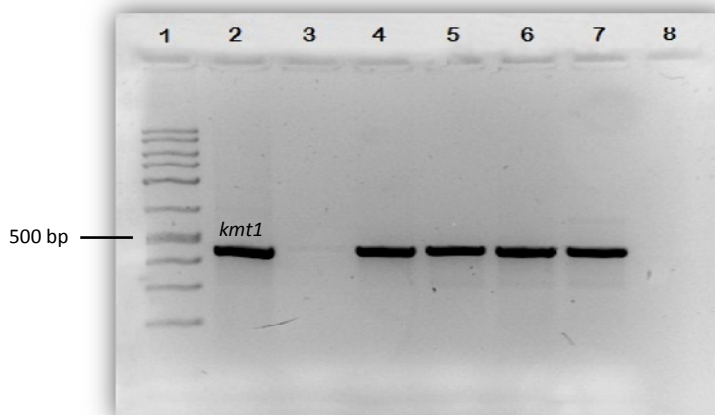


Figura 17: PCR de identificación de *P. multocida*. Gel de agarosa al 2%. Línea 1: Marcador de peso molecular, línea 2: control positivo de *P. multocida* cepa CECT4325 (460bp), línea 3: control negativo, líneas 4 – 8: aislados sospechosos de *P. multocida*.

El 100% (69/69) de los aislados clasificados como *P. multocida* por el sistema VITEK® fueron positivos a la PCR de identificación. Cabe resaltar, que tres aislados que habían sido clasificados como *P. canis* y un aislado identificado como *S. paucimobilis* por el sistema VITEK® fueron positivos a la PCR de identificación de *P. multocida*. Además, 14 de 21 aislados no diferenciados por el sistema VITEK® (Baja discriminación) fueron

identificados como *P. multocida* por la técnica de PCR. La concordancia entre las dos pruebas para clasificar a los aislados como *P. multocida*/*P. canis* fue de Kappa 0.313 (IC al 95%: 0.212-0.415) (Tabla 35). La baja concordancia se debió a los aislados en los que se obtuvo una baja discriminación en el VITEK®.

Tabla 34: Resultados de la identificación por PCR de los aislados del complejo *Mannheimia-Bibersteinia* y de *P. multocida*.

Tipo colonia	Identificación bioquímica	Nº colonias	PCR identificación complejo <i>M-B</i>	
			<i>M. haemolytica</i>	<i>B. trehalosi</i>
TH	DIATABS® (256)			
	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	1	0	1
	<i>Mannheimia glucosida</i>	11	11	0
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	236	236	0
	<i>Mannheimia</i> sp.	6	6	0
	<i>Mannheimia varigena</i>	2	2	0
	No identificadas bioqca.	213	213	0
	VITEK®			
BNH	<i>Mannheimia haemolytica</i>	2	2	0
TNH	<i>Mannheimia haemolytica</i> ^a	16	16	0
	<i>Actinobacillus/Mannheimia</i>	1	1	0
Total		488	487	1
Tipo colonia	Identificación bioquímica VITEK	Nº colonias	PCR identificación <i>P. multocida</i>	
			Positiva	Negativa
BNH-TNH	<i>Pasteurella multocida</i>	69	69	0
	<i>Pasteurella canis</i>	3	3	0
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	6	1	5
	Baja discriminación	21	14	7
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	20	0	20
	<i>Actinobacillus/Mannheimia</i>	1	0	1
	Otras bacterias	7	0	7
	No identificado	6	0	6
Total		133	87	46

^a 7 de estos aislados fueron identificados como *M. ruminalis* y 9 como *Mannheimia* sp. por DIATABS®.

Tres aislados identificados como *P. canis* por el sistema VITEK® fueron positivos a la PCR de identificación específica de *P. multocida*. Estos resultados de reacción cruzada con aislados de *P. canis* ya se han reportado en otras investigaciones, incluyendo en la investigación de Townsend *et al.* 1998, quienes diseñaron la PCR de identificación (Townsend *et al.*, 1998; Mbuthia *et al.*, 2001; Miflin y Blackall, 2001). *P. canis* fue separada de *P. multocida* por ser negativa a la fermentación de D-manitol y separada en dos biovars de acuerdo a la producción de indol (Mutters *et al.*, 1985a).

Tabla 35: Concordancia entre las pruebas del VITEK® y la PCR para la identificación de *P. multocida**

VITEK®	PCR Identificación <i>P. multocida</i>		TOTAL (N=133)
	Positiva (n=87)	Negativa (n=46)	
<i>P. multocida</i> / <i>P. canis</i>	72	0	72
<i>Baja discriminación</i>	14	7	21
<i>Otras bacterias</i>	1	39	40

*Kappa 0.313; IC 95% 0.212-0.415.

Christensen *et al.* (2004) investigaron las relaciones genotípicas entre aislados de *P. multocida* y aislados con características fenotípicas atípicas obtenidos de casos de neumonía en bovinos, previamente clasificados como *P. avium* biovar 2 y *P. canis* biovar 2 y que fueron positivas a la PCR de identificación especie-específica de *P. multocida*. Del estudio se concluye que existe un alto grado de similitud genotípica (cerca del 98,6%) de estos aislados con *P. multocida* debiendo ser reclasificada para incluir estos dos biovars. *P. multocida* es una especie genotípicamente homogénea (Mbuthia *et al.*, 2001), pero pueden existir linajes fenotípicamente diversos en relación a las características bioquímicas ODC, manitol, e indol, lo que debe ser tomado en cuenta para un adecuado diagnóstico y clasificación de esta especie (Christensen *et al.*, 2004).

V.7. IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN DEL 16S ARN RIBOSOMAL

V.7.1. Identificación por secuenciación del 16S ARNr de aislados del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia*.

La identificación mediante la detección y secuenciación del 16S ARN ribosomal se realizó en 24 aislados del complejo *M-B* en los que no se había obtenido una identificación concluyente por los sistemas de identificación bioquímica DIATABS® y VITEK®. Se identificaron: 7 aislados no hemolíticos (TNH) identificados como *M. ruminalis* por DIATABS® y como *M. haemolytica* por VITEK®, 7 aislados hemolíticos (TH) en los que no se llegó a nivel de especie por DIATABS® (*Mannheimia* sp.) y el resto de aislados no hemolíticos (9TNH y 1 BNH) clasificados como *M. haemolytica* por VITEK® pero como *Mannheimia* sp. por DIATABS® (Tabla 36).

Los resultados de la secuenciación confirman que todos aislados fueron parte del género *Mannheimia* al comparar su secuencia con las secuencias disponibles de cada uno de las especies de *Mannheimia* en la base de datos del GenBank. Para la identificación se realizó un BLAST con cada secuencia. Se consideró para la identificación final, el resultado de la prueba bioquímica de la β -glucosidasa, para distinguir entre aislados de *M. glucosida* y *M. ruminalis* (Tabla 36).

La secuenciación del 16S ARNr para identificar aislados de *M. haemolytica* ha resultado ser bastante útil, encontrándose que homologías mayores al 99,5% pueden dar resultados confiables de identificación (Angen *et al.*, 1999a). Sin embargo, esta técnica presenta baja resolución en separar e identificar aislados de *M. haemolytica* y *M. glucosida* (Angen *et al.*, 1997b). El gen 16S ARNr de aislados de *M. haemolytica* y *M. glucosida* difieren solamente en cuatro nucleótidos (Davies *et al.*, 1996). Esto se reflejó en nuestro estudio, donde en algunos casos se tuvo que recurrir al resultado de la prueba de la β -glucosidasa para lograr diferenciar y separar ambas especies.

Tabla 36: Resultados de la identificación por secuenciación del 16S ARN ribosomal de aislados del Complejo M-B.

Nº aislado	Clasificación morfológica	Hemólisis	Identificación DIATABS®	Identificación VITEK®	PCR de Identificación	% de Identidad de secuencia 16S ARN ribosomal (BLAST)	β-glucosidasa	Resultado de la identificación
M13	TNH	Negativa	<i>M. ruminalis</i>	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M24	TNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M29	TH	Positiva	<i>Mannheimia</i> sp.		Positiva	99% <i>M. haemolytica</i>	Negativa	<i>M. haemolytica</i>
M79	TH	Positiva	<i>Mannheimia</i> sp.		Positiva	99% <i>M. haemolytica</i>	Negativa	<i>M. haemolytica</i>
M92	TNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Positiva	<i>M. glucosida</i>
M122	TNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	99% <i>M. haemolytica</i>	Negativa	<i>M. haemolytica</i>
M126	TH	Positiva	<i>Mannheimia</i> sp.		Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Positiva	<i>M. glucosida</i>
M127	TNH	Negativa	<i>M. ruminalis</i>	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	100% <i>M. haemolytica</i>	Negativa	<i>M. haemolytica</i>
M155	TNH	Negativa	<i>M. ruminalis</i>	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	99% <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M200	TNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	97% <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M230	BNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Positiva	<i>M. glucosida</i>
M239	TNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	100% <i>M. haemolytica</i>	Negativa	<i>M. haemolytica</i>
M271	TH	Positiva	<i>Mannheimia</i> sp.		Positiva	99% <i>M. glucosida</i>	Positiva	<i>M. glucosida</i>
M284	TNH	Negativa	<i>M. ruminalis</i>	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	100% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M331	TNH	Negativa	<i>M. ruminalis</i>	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M353	TH	Positiva	<i>Mannheimia</i> sp.		Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M389	TNH	Negativa	<i>M. ruminalis</i>	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	100% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M431	TH	Positiva	<i>Mannheimia</i> sp.		Positiva	100% <i>M. haemolytica</i>	Negativa	<i>M. haemolytica</i>
M433	TH	Positiva	<i>Mannheimia</i> sp.		Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M442	TNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M446	TNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	100% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>
M483	TNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	100% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Positiva	<i>M. glucosida</i>
M492	TNH	Negativa	<i>Mannheimia</i> sp.	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	99% <i>M. glucosida</i> / <i>M. ruminalis</i>	Positiva	<i>M. glucosida</i>
M497	TNH	Negativa	<i>M. ruminalis</i>	<i>M. haemolytica</i>	Positiva	100% <i>M. ruminalis</i>	Negativa	<i>M. ruminalis</i>

V.7.2. Identificación por secuenciación del 16S ARN ribosomal de aislados de *P. multocida*

Se realizó la detección y secuenciación del 16S ARN ribosomal a 18 aislados identificados como *P. multocida* por la PCR de identificación y como *P. canis*, *S. paucimobilis* o baja discriminación con el sistema VITEK®.

Las secuencias fueron alineadas y comparadas con las disponibles para *P. multocida* en la base de datos del GenBank. Se realizó un BLAST para determinar el porcentaje de homología. El 100% (18/18) fueron identificados como *P. multocida* con una homología superior al 98%. Los resultados se resumen en la Tabla 37.

En nuestro estudio se recurrió a la secuenciación del 16S para comprobar los resultados discordantes con la PCR de identificación especie específica. Al igual que en otros estudios donde se utilizó esta técnica para identificar aislados de *P. multocida* obtenidos del tracto respiratorio y vagina de ovejas (Davies, R. L. *et al.*, 2003), nuestros aislados fueron identificados de forma precisa.

Tabla 37: Identificación de aislados sospechosos de *P. multocida* por secuenciación del 16S ARN ribosomal

Nº aislado	Clasificación morfológica	Identificación bioquímica	PCR de identificación (<i>kmt1</i>)	% de Identidad de secuencia 16S ARN ribosomal (BLAST)
M76	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	99% <i>P. multocida</i>
M107	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	100% <i>P. multocida</i>
M108	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	100% <i>P. multocida</i>
M154	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	99% <i>P. multocida</i>
M199	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	100% <i>P. multocida</i>
M201	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	100% <i>P. multocida</i>
M208	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	99% <i>P. multocida</i>
M215	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	100% <i>P. multocida</i>
M221	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	99% <i>P. multocida</i>
M248	BNH	<i>Pasteurella canis</i>	POSITIVA	99% <i>P. multocida</i>
M249	BNH	<i>Pasteurella canis</i>	POSITIVA	99% <i>P. multocida</i>
M251	BNH	<i>Pasteurella canis</i>	POSITIVA	100% <i>P. multocida</i>
M278	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	100% <i>P. multocida</i>
M473	TNH	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	POSITIVA	100% <i>P. multocida</i>
P64	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	98% <i>P. multocida</i>
P65	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	100% <i>P. multocida</i>
P85	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	98% <i>P. multocida</i>
P86	BNH	Baja discriminación	POSITIVA	99% <i>P. multocida</i>

V.8. RESULTADOS GLOBALES DE LA IDENTIFICACIÓN DEL Complejo *Mannheimia-Bibersteinia* y *P. multocida*.

La identificación final de los aislados del Complejo *M-B* se realizó tomando en cuenta el resultado de cada una de las pruebas realizadas para su identificación (bioquímica, PCR y secuenciación del 16S ARN ribosomal). Los resultados de la identificación final se indican en la Tabla 38.

Tabla 38: Resultado final de identificación de los aislados del Complejo *M-B* y de *P. multocida* aislados de los pulmones de corderos teniendo en cuenta los resultados de la identificación bioquímica, la identificación por PCR y la secuenciación del 16S ARNr

Fam. <i>Pasteurellaceae</i> Género (nº aislados)	Especie	Nº aislados	Nº pulmones de procedencia
<i>Mannheimia</i> (487)	<i>M. haemolytica</i>	456	139
	<i>M. glucosida</i>	17	16
	<i>M. ruminalis</i>	12	12
	<i>M. varigena</i>	2	1
<i>Bibersteinia</i> (1)	<i>B. trehalosi</i>	1	1
<i>Pasteurella</i> (87)	<i>P. multocida</i>	87	73

La identificación definitiva de las bacterias del Complejo *M-B* es compleja, debido a las frecuentes variaciones en la clasificación taxonómica, siendo necesario para una identificación precisa el análisis fenotípico y genotípico de las cepas (Angen *et al.*, 2002). La transferencia horizontal de genes y la recombinación genética en este género ha sido un importante mecanismo de evolución y diversificación de factores de virulencia (Sachse y Frey, 2003).

La limitada confiabilidad en los métodos de serotipificación y fenotipificación en las especies de *Mannheimia* (Angen *et al.*, 1999a; Angen *et al.*, 1999b; Rowe *et al.*, 2001) y *Pasteurella* (Wilson *et al.*, 1993; Jacques *et al.*, 1994; Hunt Gerardo *et al.*, 2001) debido a las variaciones encontradas y a la influencia en las características fenotípicas de factores como las condiciones de cultivo, demuestra la complejidad en la identificación de estos microorganismos (Catry *et al.*, 2004). Estos autores enfatizan en que la identificación de especies de *Mannheimia* debe darse a través de la combinación de métodos de fenotipificación y genotipificación.

V.9. TIPIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *MANNHEIMIA* Y *BIBERSTEINIA*

V.9.1. Serotipificación por Hemaglutinación Indirecta (HI)

Se determinó el serotipo capsular de los 488 aislados del Complejo *M-B* utilizando la técnica de hemaglutinación indirecta descrita por Biberstein (1978). Esta técnica identifica los 12 serotipos capsulares de *M. haemolytica* (serotipos A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) y el único serotipo de *M. glucosida* (serotipo A11) (Biberstein, 1978). Los serotipos más frecuentes fueron el A7 (12,7%) y el A6 (10,5%) seguidos del A9 (8,4%), el A12 (7,8%), el A5 (6,6%), el A2 (4,7%) y el A8 (4,7%). Otros serotipos detectados con una frecuencia menor al 4% fueron A1, A11, A13, A14 y A17 con 3,1% (15/488), 0,6% (3/488), 1,6% (8/488), 0,2% (1/488) y 1,2% (6/488) respectivamente. El 37,9% (185/488) fue no tipificable (NT) (Tabla 39).

En los aislados de *M. haemolytica* se observaron reacciones positivas a todos los serotipos excepto a los serotipos A15 y A16. Los serotipos más comunes, con más de 8% de positividad, fueron: A6 con 10,7% (49/456), A7 con 10,1% (46/456), A12 con 8,3% (38/456) y A9 con 9,0% (41/456). De los 17 aislados identificados como *M. glucosida*, el 64,7% (11/17) fue tipificado como serotipo A7, el 17,6% (3/17) fueron NT, y de los serotipos A1, A6 y A11 solo se detectó un aislado en cada uno 5,9% (1/17). De los 12 aislados identificados como *M. ruminalis*, el 41,7% (5/12) fueron identificados como serotipo A7 y NT cada uno. Solo se obtuvo un aislado de los serotipos A6 y A11 8,3% (1/12). Los 2 aislados identificados como *M. varigena* fueron no tipificables (NT) (Tabla 39).

Estudios de serotipificación de aislados de *M. haemolytica* obtenidos de ovejas se han realizado en otros países que incluyen Alemania (Fodor *et al.*, 1984), Bulgaria (Dikova, 1975), EE.UU. (Frank, 1982; Al-Ghamdi *et al.*, 2000), Etiopia (Sisay y Zerihun, 2003), Francia (Villard *et al.*, 2006), Hungría (Fodor *et al.*, 1999), Kenia (Mwangota *et al.*, 1978), México (Colin *et al.*, 1987; Blanco-Viera *et al.*, 1995), Nigeria (Odugbo *et al.*, 2003), Noruega (Poulsen *et al.*, 2006), Nueva Zelanda (Prince *et al.*, 1985), Reino Unido (Thompson *et al.*, 1977; Gilmour y Gilmour, 1989b), Somalia (Pegram, 1974), Sudáfrica (Odendaal y Henton, 1995), Sudan (Hussein y El Sawi Mohamed, 1984) y Turquía (Diker *et al.*, 1999; Kirkan y Kaya, 2005; Ilhan y Keles, 2007).

Tabla 39: Serotipos capsulares detectados en los aislados identificados como parte del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia*

SEROTIPO (HI)	<i>M. haemolytica</i> (n=456)		<i>M. glucosida</i> (n= 17)		<i>M. ruminalis</i> (n=12)		<i>M. varigena</i> (n=2)		<i>B. trehalosi</i> (n=1)		Total (N=488)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
A1	14	3,1	1	5,9	0	0	0	0	0	0	15	3,1
A2	23	5,0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	4,7
A5	32	7,0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	6,6
A6	49	10,7	1	5,9	1	8,3	0	0	0	0	51	10,5
A7	46	10,1	11	64,7	5	41,7	0	0	0	0	62	12,7
A8	23	5,0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	4,7
A9	41	9,0	0	0	0	0	0	0	0	0	41	8,4
A11	1	0,2	1	5,9	1	8,3	0	0	0	0	3	0,6
A12	38	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	38	7,8
A13	8	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1,6
A14	1	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,2
A17	6	1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1,2
NT*	174	38,2	3	17,6	5	41,7	2	100,0	1**	100	185	37,9

*NT: No tipificable, **Incluye aislados no evaluados con los antisueros correspondientes a los serotipos de *B. trehalosi*.

Un amplio rango de serotipos se encuentran en ovinos comparados con los presentes en bovinos (Frank *et al.*, 1989; Gilmour y Gilmour, 1989b). Los serotipos A1, A5, A6, A7, A8, A9, A11 y A12, han sido asociados a procesos infecciosos en ovejas, aunque el más frecuente se considera el serotipo A2 (Thompson *et al.*, 1977; Trigo, 1987; Gilmour y Gilmour, 1989b; Davies *et al.*, 1997; Fodor *et al.*, 1999; Kirkan y Kaya, 2005; İlhan y Keles, 2007). Adicionalmente el serotipo A17 también se ha descrito en ovejas (Younan y Fodor, 1995).

La frecuencia relativa de los distintos serotipos depende de la zona geográfica e incluso el tipo de muestra analizada. En Kenia, 15 serotipos diferentes de *M. haemolytica* y algunos NT han sido aislados de ovejas (Mwangota *et al.*, 1978). En Nigeria se identificaron al menos 8 serotipos distintos (A1, A2, A6, A7, A8, A9, T10 y A11), siendo los más frecuentes A2 (36,1%), A11 (13,6%), A6 (12,1%) y aislados NT (21,3%) en ovinos (Odugbo *et al.*, 2003). En EE.UU. el serotipo A2 fue el más frecuente, sin embargo los serotipos A1, A7, A8 y A9 y NT fueron recuperados con relativa frecuencia (Frank, 1982). En Hungría, los serotipos A1, A2, A7, A9 y A6 fueron aislados de animales con neumonía, mientras que serotipos de *B. trehalosi* y *M. glucosida* fueron muy poco frecuentes (Fodor *et al.*, 1984). Y en México los estudios realizados por Colin *et al.* 1987, revelaron que los serotipos A2, A1, A5 y A11 fueron los más comúnmente aislados (Colin *et al.*, 1987).

En resumen, aunque el serotipo A2 es el más frecuente en la mayoría de los estudios, los serotipos A7, A9, A6 y A8 también se ha detectado con frecuencia. En nuestro estudio los serotipos A7 y A6 fueron los más frecuentes, después de los aislados NT. Estudios realizados en bovinos, indican un aumento en la prevalencia del serotipo A6 tanto en EE.UU. Japón y Europa (Katsuda *et al.*, 2008). En nuestro estudio, el serotipo A6 fue el segundo serotipo más frecuente.

Los aislados no tipificables han sido frecuentes en nuestro estudio. A pesar de que la frecuencia de aislados NT en nuestro estudio fue alta, no es poco común la presencia de este tipo de aislados en pulmones de ovinos. Otros investigadores determinaron que los aislados NT fueron los segundos más frecuentes en las muestras analizadas

(Donachie *et al.*, 1984; Odugbo *et al.*, 2003). Se sabe que alrededor del 10% de los aislados de rumiantes son no tipificables (Fraser *et al.*, 1982a; Quirie *et al.*, 1986).

Los aislados NT se han descrito como aislados que pueden haber perdido su habilidad para producir polisacárido capsular (Gentry *et al.*, 1988). Davies *et al.* (1996) detectaron 5 grupos distintos entre 30 aislados NT examinados, revelándose algunas similitudes filogenéticas entre estos aislados y otros que sí pudieron ser tipificados (Davies *et al.*, 1996).

Los aislados identificados como *M. glucosida* en este estudio, fueron en su mayoría del serotipo A7 o NT. *M. glucosida* es genéticamente muy diversa (Mutters *et al.*, 1986; Davies *et al.*, 1997). Este alto grado de heterogeneidad es consistente, según algunos autores (Davies *et al.*, 1996), con que esta especie esté compuesta por un grupo de patógenos oportunistas de baja virulencia no asociados a enfermedades primarias en ovejas de forma similar a lo observado en otras bacterias gram negativas como *E. coli* (Whittam, 1995). Davies *et al.* (1997) determinaron que dentro de *M. glucosida* hay al menos dos linajes distintos representados por cepas del serotipo A11 y otro grupo de aislados no tipificables pero con características similares denominado UG3 (Mutters *et al.*, 1986; Davies *et al.*, 1997).

La especificidad del serotipado como una herramienta de diagnóstico ha sido investigada por varios autores (Angen *et al.*, 1999b; Angen *et al.*, 2002). Los serotipos A6, A7, A9 y A16 han sido encontrados en otras especies bacterianas (Angen *et al.*, 1999b; Angen *et al.*, 2002) indicando que si este método es utilizado de forma aislada no es específico para la identificación bacteriana.

El tipo capsular parece no ser indicativo de las relaciones genéticas entre aislados de *M. haemolytica* (Davies *et al.*, 1997). El serotipo A2, por ejemplo, solo está presente en el linaje C (linaje descrito en el estudio de Davies *et al.*, 1997), lo que sugiere que en este serotipo la estructura capsular está conservada, y que A2 representa un serotipo capsular ancestral en este linaje. En cambio, basándose en la estrecha relación filogenética que existe entre los serotipos A1, A5, A6, A8, A9, A12, A14, A16 y UG1, agrupados dentro del linaje A, se puede deducir que estos serotipos podrían poseer

una cápsula estructuralmente muy similar. Además, los serotipos A7 y A13 pueden ser estructuralmente muy similares (Davies *et al.*, 1997).

Los aislados de los serotipos A1 y A6 de bovinos comparados con los aislados de los mismos serotipo en ovinos, pueden ser diferenciados por sus perfiles de OMP. Lo mismo ocurre con los aislados del serotipo A2 de ovinos y bovinos los cuales son similarmente distinguibles (Davies *et al.*, 1997). Esto sugiere la existencia de distintas subpoblaciones de serotipos A1, A2 y A6 presentes en bovinos y ovinos, y que aislados del mismo serotipo provenientes de diferentes especies son filogenéticamente distintos (Davies *et al.*, 1997). Los dos únicos aislados de *M. varigena* obtenidos en este estudio fueron NT. Resultados similares fueron encontrados por Angen *et al.* (1999a), donde de 19 aislados de *M. varigena* evaluados todos fueron NT (Angen *et al.*, 1999a).

V.9.2. Factores de virulencia en aislados del Complejo *M-B*

V.9.2.1. Detección del gen *lktA* que codifica la proteína estructural de la Leucotoxina

El análisis de PCR para la detección de la Leucotoxina (Figura 18) se realizó a los 488 aislados del complejo *M-B*. Los resultados revelan que el 95,3% (465/488) de las colonias estudiadas presentaban el gen *lktA* codificante de la región activa de la leucotoxina (Tabla 40).

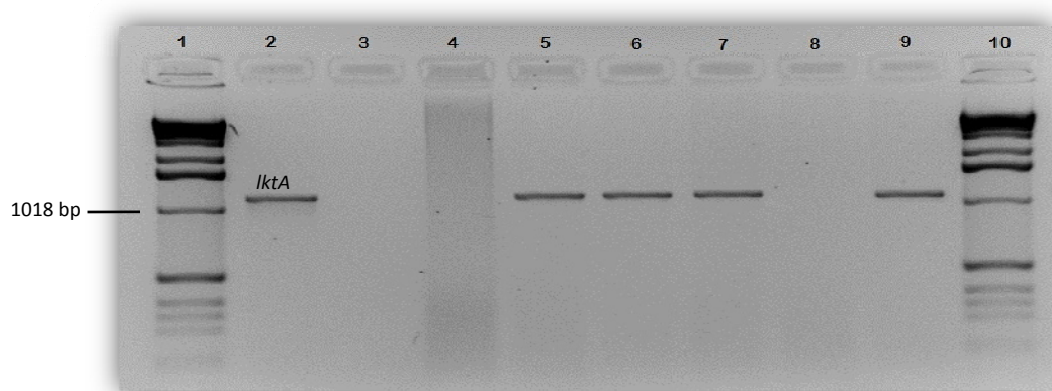


Figura 18: PCR de detección del gen *lktA*. Gel de agarosa al 1%. Líneas 1 y 10: Marcador de peso molecular Roche (12,2kbp), línea 2: Control Positivo de *M. haemolytica* (CECT924) 1145bp, línea 3: control negativo, líneas 4-9: aislados del Complejo *M-B*.

Para confirmar que la secuencia amplificada se correspondía con el gen *lktA* se realizó la purificación de ADN de la banda en el gel de agarosa y se envió a secuenciar, los resultados de las cuatro muestras enviadas a secuenciar se introdujeron en la base de datos del NCBI y se realizó un BLAST obteniéndose un 98% de homología con el gen *lktA*. Además se analizó la asociación entre la producción de hemólisis y la presencia del gen *lktA*, evidenciándose que ambas características se encuentran asociadas ($P < 0,000$) (Tabla 40).

Hasta hace un par de años, la única prueba para la identificación genotípica de los miembros del complejo *M-B* era la técnica de PCR utilizada en este estudio, la cual detecta el gen *lktA* que representa la parte activa de la leucotoxina. Este gen está presente en todas las cepas del Complejo *M-B* pero no es específico de especie (Burrows, L. L. *et al.*, 1993; Fisher *et al.*, 1999).

Tabla 40: Asociación entre la producción de de hemólisis y la detección del gen *lktA* codificante de la región activa de la leucotoxina en los 488 aislados del complejo *M-B*

Especie	Nº aislados	PCR <i>lktA</i>		Hemólisis	
		Positiva	negativa	Positiva	negativa
<i>M. haemolytica</i>	456	449	7	445	11
<i>M. glucosida</i>	17	13	4	13	4
<i>M. ruminalis</i>	12	0	12	2	10
<i>M. varigena</i>	2	2	0	2	0
<i>B. trehalosi</i>	1	1	0	1	0
Total	488	465*	23	463	25

* $P < 0,000$ al 95% de confianza. O.R.: 613,33 IC 95% (136,89 - 2748,11)

La leucotoxina tiene una elevada homología con la α -hemolisina de *E. coli* (Strathdee & Lo, 1987). La actividad hemolítica de *M. haemolytica* se asocia a la presencia o ausencia del locus funcional "*lktCABD*" (Murphy *et al.*, 1995). En nuestro estudio dos aislados que fueron negativos al gen *lktA* mostraron actividad hemolítica. A pesar de esa variación, la asociación entre la presencia de hemólisis y la detección del gen codificante de la leucotoxina no se vio afectada, y se corroboró lo observado en otros estudios (Burrows, *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1999).

Solo cuatro aislados de *M. haemolytica* que fueron positivos a la PCR del gen *lktA* no produjeron hemólisis en el agar sangre. Esto ya ha sido observado en otros estudios (Fisher *et al.*, 1999). La pérdida de la actividad hemolítica puede estar relacionado con una disfunción asociada con la producción de leucotoxina o con su péptido activador LktC. Highlander *et al.* (1997) establecieron que la actividad hemolítica de LktA es dependiente de la activación del polipéptido LktC; y Fedorova y Highlander 1997, demostraron que la interrupción en el gen *lktC* resulta en la secreción de una proteína LktA no hemolítica y sin actividad de leucotoxina (Highlander *et al.*, 1990; Fedorova y Highlander, 1997a).

Un fenotipo no hemolítico puede estar también asociado a mutaciones en los genes *lktB* y *lktD* los cuales son necesarios para el transporte de la leucotoxina (Strathdee y Lo, 1989a). Además, Barbour *et al.* 1997, determinaron una significativa pérdida de la capacidad de producir hemólisis con los subcultivos, en los aislados obtenidos de ovinos y bovinos enfermos, en comparación con los aislados obtenidos de animales sanos (Barbour *et al.*, 1997).

Llama la atención la detección de dos aislados de *M. ruminalis* con fenotipo hemolítico pero negativa a la PCR de detección de la leucotoxina. Se sabe que, los aislados de *M. ruminalis* varían en la capacidad de producir hemólisis y que algunos aislados que pueden considerarse con capacidad hemolítica pueden tener mutaciones en el operon “*lktCABD*” (Larsen *et al.*, 2007b) y, por tanto, no haber sido detectadas por la PCR de detección de la leucotoxina.

V.9.2.2. Detección de 15 genes (*adhes*, *fhaC*, *gcp*, *hf*, *irp*, *lpsA*, *nanH*, *pilA*, *plpD*, *pomA*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *tbpB* y *tonB*) codificantes de factores de virulencia en aislados del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia*

Se investigaron un total de 15 genes (*adhes*, *fhaC*, *gcp*, *hf*, *irp*, *lpsA*, *nanH*, *pilA*, *plpD*, *pomA*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *tbpB* y *tonB*) que codifican los principales factores de virulencia de *M. haemolytica* utilizando tres protocolos de PCR múltiple (FV1, FV2 y FV3) (Figuras 19, 20 y 21).

Para la puesta a punto de los protocolos de PCR basados en cebadores diseñados en este estudio se secuenciaron los productos de PCR obtenidos de distintos aislados, cuatro muestras enviadas a secuenciar por gen.

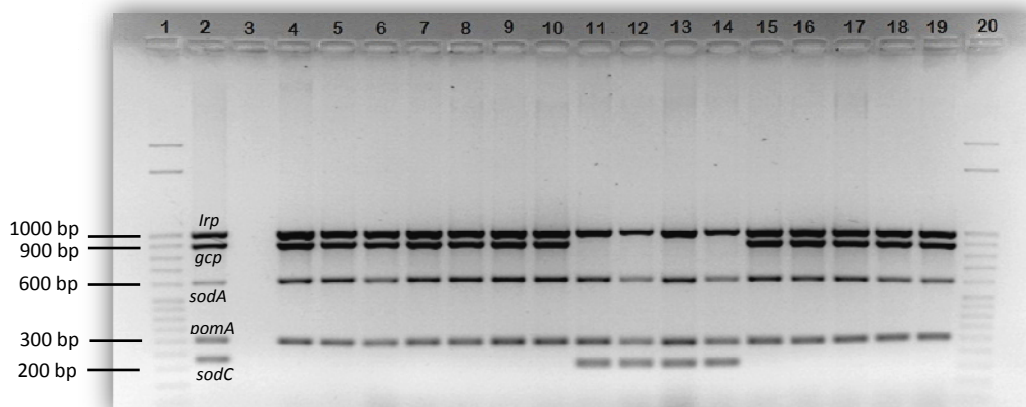


Figura 19: PCR múltiple de identificación de factores de virulencia – FV1 (genes *irp* 1025bp, *gcp* 912 bp, *sodA* 624bp, *pomA* 310bp y *sodC* 230bp). Gel de agarosa al 1,5%, 70V. Líneas 1 y 20: Marcador de peso molecular (3000bp) Sigma Aldrich, línea 2: Control positivo de los cinco genes cepa de *M. haemolytica* CECT924, línea 3: control negativo, líneas 4 – 19: aislados de campo de *M. haemolytica*.

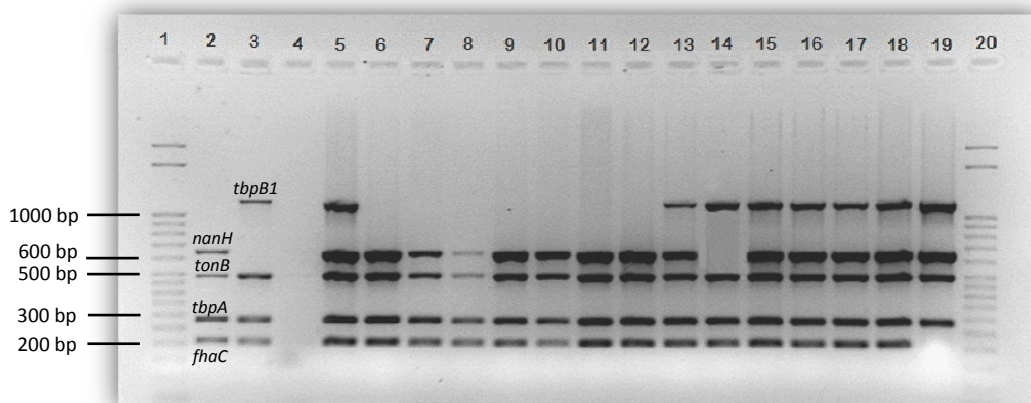


Figura 20: PCR múltiple de identificación de factores de virulencia – FV2 (genes *tbpB1* 1221bp, *nanH* 660bp, *tonB* 504bp, *tbpA* 285bp y *fhaC* 207bp). Gel de agarosa al 1,5%. Líneas 1 y 20: Marcador de peso molecular (3000bp), línea 2: Control positivo de los genes (*nanH*, *tonB*, *tbpA* y *fhaC*) cepa de *M. haemolytica* CECT924, línea 3: control positivo de los genes (*tbpB1*, *tonB*, *tbpA* y *fhaC*) cepa PH344 de *Mannheimia glucosida*, línea 4: control negativo, líneas 5 – 19: aislados de campo de *Mannheimia haemolytica*.

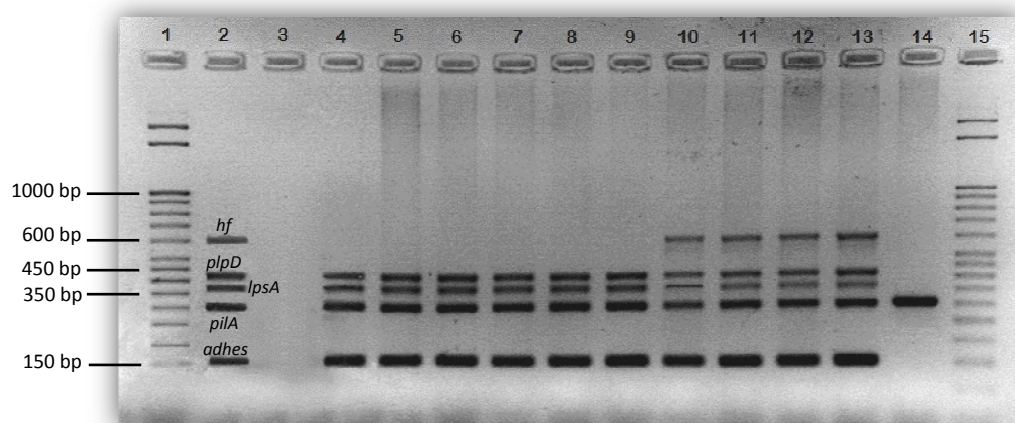


Figura 21: PCR múltiple de identificación de factores de virulencia – FV3 (genes *hf* 621bp, *plpD* 436bp, *lpsA* 385bp, *pilA* 311bp, y *adhes* 155bp). Gel de agarosa al 1,5%, 70V. Líneas 1 y 15: Marcador de peso molecular (3000bp), línea 2: Control positivo de los cinco genes cepa de *M. haemolytica* CECT924, línea 3: control negativo, líneas 4 – 14: aislados de campo de *M. haemolytica*.

En la Tabla 41 se muestran los resultados de la detección de los 15 genes de factores de virulencia estudiados en cepas patrón de *M. haemolytica* y *B. trehalosi* cedidas por otros autores o de colecciones tipo. El gen *lktA* se detectó en todas las cepas patrón y se obtuvieron resultados variables para otros factores de virulencia.

En la Tabla 42 se muestran los resultados de los aislados del complejo *M-B* obtenidos en este estudio. Los genes *adhes*, *fhaC*, *nanH*, *pilA*, *sodA*, *tbpA*, *tbpB* y *tonB* fueron detectados en más del 90% de los aislados. Los genes *plpD*, *pomA*, *gcp*, *hf*, *lpsA* e *irp* tuvieron un porcentaje de detección de 87,7% (428/488), 86,7% (423/488), 77,0% (376/488), 71,7%(350/488), 67,0% (327/488) y 59,2% (289/488) respectivamente.

El gen con el menor porcentaje de detección fue el *sodC* con solo un 17,4% (85/488) de aislados positivos. La detección de genes de virulencia fue menos frecuente en aislados de *M. ruminalis*, donde todos los aislados fueron negativos a los genes *gcp*, *hf*, *lktA* y *pomA*. Los aislados no hemolíticos de *M. ruminalis* han podido perder sus factores de virulencia con respecto a sus antecesores patógenos (Larsen *et al.*, 2009). Por lo que se podría especular que los aislados β -hemolíticos de *M. ruminalis* podrían representar una forma intermedia (Poulsen *et al.*, 2006).

Tabla 41: Detección de genes de virulencia en cepas patrón del complejo *M-B* utilizadas en este estudio

Identificación	Cepa patrón	Serotipo	Procedencia	Equivalencia ATCC/NCTC	Factores de virulencia estudiados															
					<i>lktA</i>	<i>irp</i>	<i>gcp</i>	<i>sodA</i>	<i>pomA</i>	<i>sodC</i>	<i>hf</i>	<i>plpD</i>	<i>lpsA</i>	<i>pilA</i>	<i>adhes</i>	<i>tbpB</i>	<i>nanH</i>	<i>tonB</i>	<i>tbpA</i>	<i>fhaC</i>
<i>M. haemolytica</i>	NCTC 10609	A1	NCTC	ATCC 29694	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH2	A1	R. Davies		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	CECT 924	A2	CECT		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	CECT 5941	A2	NCTC		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH278	A2	R. Davies		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	A2	A2	L. Fodor		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	2	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH50	A5	R. Davies		+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	NCTC 10632	A6	NCTC		+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH376	A6	R. Davies		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	6174	A6	L. Fodor		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	NCTC 10634	A7	NCTC		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH296	A7	R. Davies		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	NCTC 10636	A8	NCTC		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH56	A8	R. Davies		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	NCTC 10638	A9	NCTC		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH238	A9	R. Davies		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	6177	A9	L. Fodor		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH346	A12	R. Davies		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH588	A13	R. Davies		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	1	+	+	+	-
<i>M. haemolytica</i>	A-13	A13	L. Fodor		+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH66	A14	R. Davies		+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	A-14	A14	L. Fodor		+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	1	-	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH706	A16	R. Davies		+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	S66	A17	L. Fodor		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	2	+	+	+	+

...continuación

Identificación	Cepa patrón	Serotipo	Procedencia	Equivalencia ATCC/NCTC	Factores de virulencia estudiados															
					<i>lktA</i>	<i>irp</i>	<i>gcp</i>	<i>sodA</i>	<i>pomA</i>	<i>sodC</i>	<i>hf</i>	<i>plpD</i>	<i>lpsA</i>	<i>pilA</i>	<i>adhes</i>	<i>tbpB</i>	<i>nanH</i>	<i>tonB</i>	<i>tbpA</i>	<i>fhaC</i>
<i>M. haemolytica</i>	PH156	UG1	R. Davies	NCTC 11550	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	1	+	-	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH318	UG1	R. Davies		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH612	UG1	R. Davies		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH154	UG1	R. Davies		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH452	UG1	R. Davies		+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	1	+	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH692	UG2	R. Davies		+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH474	UG3	R. Davies		+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	1	-	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH496	UG3	R. Davies		+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	1	-	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH290	UG3	R. Davies		+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	1	-	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH152	UG3	R. Davies		+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	1	-	+	+	+
<i>M. haemolytica</i>	PH150	UG3	R. Davies		+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	1	-	+	+	-
<i>M. glucosida</i>	NCTC 10642	A11	NCTC		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	1	-	+	+	+
<i>M. glucosida</i>	PH344	A11	R. Davies		+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	1	-	+	+	+
<i>M. glucosida</i>	6179	A11	L. Fodor	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	1	-	+	+	+	
<i>B. trehalosi</i>	PH68	T3	R. Davies	NCTC 10626	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3	-	-	+	-	
<i>B. trehalosi</i>	6171	T3	L. Fodor		+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	1	-	+	+	-
<i>B. trehalosi</i>	NCTC 10639	T4	NCTC		+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	3	-	-	-	-
<i>B. trehalosi</i>	PH246	T4	R. Davies	NCTC 10641	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3	-	-	+	-
<i>B. trehalosi</i>	NCTC 10641	T10	NCTC		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	3	-	-	+	-
<i>B. trehalosi</i>	PH252	T10	R. Davies		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3	-	-	+	-
<i>B. trehalosi</i>	NCTC 10370	T15	NCTC	NCTC 10370	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3	-	-	+	-
<i>B. trehalosi</i>	PH254	T15	R. Davies		+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3	+	+	+	+
<i>B. trehalosi</i>	T-15	T15	L. Fodor		+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3	-	-	+	-

Tabla 42: Genes detectados en cada uno de las bacterias identificadas del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia*.

Gen de virulencia ^a	<i>M. haemolytica</i> (n=456)		<i>M. glucosida</i> (n= 17)		<i>M. ruminalis</i> (n=12)		<i>M. varigena</i> (n=2)		<i>B. trehalosi</i> (n=1)		Total de Positivos (N=488)	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>adhes</i>	431	94,5	9	52,9	3	25,0	1	50,0	1	100,0	444	91,0
<i>fhaC</i>	426	93,4	16	94,1	4	33,3	2	100,0	0	0,0	448	91,8
<i>gcp</i>	368	80,7	8	47,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	376	77,0
<i>hf</i>	342	75,0	8	47,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	350	71,7
<i>irp</i>	275	60,3	10	58,8	4	33,3	0	0,0	1	0,0	289	59,2
<i>lktA</i>	449	98,5	13	76,5	0	0,0	2	100,0	1	100,0	465	95,3
<i>lpsA</i>	319	70,0	6	35,3	2	16,7	0	0,0	0	0,0	327	67,0
<i>nanH</i>	442	96,9	6	35,3	4	33,3	2	100,0	1	100,0	455	93,2
<i>pilA</i>	445	97,6	17	100	11	91,7	2	100,0	0	0,0	475	97,3
<i>plpD</i>	417	91,4	9	52,9	1	8,3	0	0,0	1	100,0	428	87,7
<i>pomA</i>	417	91,4	6	35,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	423	86,7
<i>sodA</i>	420	92,1	14	82,4	7	58,3	0	0,0	0	0,0	441	90,4
<i>sodC</i>	82	18,0	2	11,8	1	8,3	0	0	0	0,0	85	17,4
<i>tbpA</i>	448	98,2	13	76,5	3	25,0	2	100	1	100	467	95,7
<i>tbpB</i>	440	96,5	10	58,8	1	8,3	2	100	0	0,0	453	92,8
<i>tonB</i>	444	97,4	13	76,5	3	25,0	2	100	1	100	463	94,9

Tabla 43: Distribución de los factores de virulencia de acuerdo a los serotipos capsulares entre los 488 aislados del Complejo *M-B*

Gen de virulencia ^a	Nº (%) de FV's en los serotipos capsulares												
	A1 (n=15)	A2 (n= 23)	A5 (n=32)	A6 (n=51)	A7 (n=62)	A8 (n=23)	A9 (n=41)	A11 (n=3)	A12 (n=38)	A13 (n=8)	A14 (n=1)	A17 (n=6)	NT ^b (n=185)
<i>adhes</i>	13 (86,7)	22 (95,7)	32 (100)	50 (98,0)	42 (66,7)	22 (95,7)	41 (100)	1 (33,3)	38 (100)	8 (100)	1 (100)	5 (83,3)	169 (91,4)
<i>fhaC</i>	13 (86,7)	23 (100)	32 (100)	50 (98,0)	52 (83,9)	23 (100)	32 (78,0)	1 (33,3)	38 (100)	0 (0)	1 (100)	4 (66,7)	179 (96,8)
<i>gcp</i>	13 (86,7)	10 (43,5)	30 (93,8)	45 (88,2)	39 (62,9)	22 (95,7)	40 (97,6)	1 (33,3)	37 (97,4)	8 (100)	1 (100)	4 (66,7)	127 (68,6)
<i>hf</i>	14 (93,3)	14 (60,9)	3 (9,4)	46 (90,2)	32 (51,2)	16 (69,6)	30 (73,2)	1 (33,3)	38 (100)	0 (0)	1 (100)	4 (66,7)	151 (81,6)
<i>irp</i>	11 (73,3)	22 (97,5)	30 (93,8)	8 (15,7)	43 (69,4)	21 (93,3)	3 (7,3)	2 (66,7)	35 (92,1)	7 (87,5)	0 (0)	3 (50)	104(56,2)
<i>lktA</i>	14 (93,3)	23 (100)	32 (100)	50 (98,0)	51 (82,3)	23 (100)	41 (100)	1 (33,3)	38 (100)	8 (100)	1 (100)	5 (83,3)	178 (96,2)
<i>lpsA</i>	14 (93,3)	5 (21,7)	29 (90,6)	48 (94,1)	31 (50,0)	22 (95,7)	40 (97,6)	1 (33,3)	35 (92,1)	8 (100)	1 (100)	4 (66,7)	89 (48,1)
<i>nanH</i>	14 (93,3)	23 (100)	32 (100)	48 (94,1)	44 (71,0)	23 (100)	41 (100)	0 (0)	38 (100)	8 (100)	1 (100)	6 (100)	177 (95,7)
<i>pilA</i>	12 (80,0)	23 (100)	32 (100)	51 (100)	59 (95,2)	22 (95,7)	40 (97,6)	3 (100)	38 (100)	8 (100)	1 (100)	6 (100)	87 (97,8)
<i>plpD</i>	14 (93,3)	22 (95,7)	32 (100)	49 (96,1)	40 (64,5)	22 (95,7)	38 (92,7)	1 (33,3)	35 (92,1)	8 (100)	0 (0)	6 (100)	161 (87,0)
<i>pomA</i>	11 (73,3)	19 (82,6)	30 (93,8)	48 (94,1)	37 (59,7)	22 (95,7)	40 (97,6)	2 (66,7)	38 (100)	8 (100)	1 (100)	5 (83,3)	162 (87,6)
<i>sodA</i>	15 (100)	21 (91,3)	31 (96,9)	47 (92,2)	57 (91,9)	17 (73,9)	40 (97,6)	0 (0)	38 (100)	8 (100)	1 (100)	5 (83,3)	161 (87,0)
<i>sodC</i>	0 (0)	13 (56,5)	3 (9,4)	1 (2,0)	13 (21,0)	0 (0)	4 (9,8)	0 (0)	2 (5,3)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	48 (25,9)
<i>tbpA</i>	14 (93,3)	23 (100)	32 (100)	50 (98,0)	51 (82,3)	23 (100)	41 (100)	1 (33,3)	38 (100)	8 (100)	1 (100)	6 (100)	179 (96,8)
<i>tbpB</i>	14 (93,3)	23 (100)	32 (100)	49 (96,1)	45 (72,6)	22 (95,7)	41 (100)	1 (33,3)	38 (100)	8 (100)	1 (100)	6 (100)	174 (94,1)
<i>tonB</i>	14 (93,1)	23 (100)	32 (100)	50 (98,0)	49 (79,0)	23 (100)	41 (100)	1 (33,3)	38 (100)	8 (100)	1 (100)	6 (100)	177 (95,7)

^a. Todos los genes fueron detectados por PCR. ^b. Aislados no tipificables.

Cabe resaltar que el gen *nanH* que codifica una neuraminidasa también pudo detectarse en el 35,3% de aislados de *M. glucosida* y esta especie bacteriana ha sido reportada como carente de neuraminidasa (Straus *et al.*, 1993b). Debemos tener en cuenta que solo el serotipo A11 se ha descrito para *M. glucosida*, mientras que en nuestro estudio también hemos detectado otros serotipos en esta bacteria. Al parecer la falta de neuraminidasa se asocia más precisamente con el serotipo que con la especie bacteriana. Nuestro único aislado de *M. glucosida* identificado como del serotipo A11 no presentó el gen *nanH*.

Escasos estudios se han llevado a cabo para detectar genes asociados a la virulencia en aislados de *M. haemolytica*. Un estudio realizado por Ewers (2006) detectó que los genes *lktA*, *pomA*, *tbpB* y *tbpA* fueron regularmente identificados en todos los aislados de *M. haemolytica*. Mientras que, los genes *tonB*, *irp*, *gcp* y *sodA* fueron frecuentes solo en aislados del biogrupo 1 (Ewers, 2006). Similares hallazgos hemos encontrado en este estudio donde la mayoría de genes evaluados fueron bastante frecuentes en los aislados de *M. haemolytica*. La detección de cada gen de virulencia de acuerdo al serotipo capsular se resume en la Tabla 43. La frecuencia de detección del gen *sodC* fue mayor en los serotipos A2 (56,5%) y A7 (21,0%) respecto al resto de serotipos y respecto al total.

V.9.2.3. Detección de tres subtipos del gen *tbpB*

La detección del gen *tbpB* se realizó utilizando tres pares de cebadores que identificaban tres subtipos del mismo gen que fueron nombrados como TBPB1, TBPB2 Y TBPB3. La utilización de tres pares de cebadores distintos se realizó, porque al momento de diseñarlos se observó poca homología entre las secuencias del gen *tbpB* de aislados del complejo *M-B* disponibles en el GenBank que, sin embargo, podían agruparse en tres subtipos distintos. Al momento del alineamiento de las secuencias del gen *tbpB* de las bacterias del Complejo *M-B*, se observó que las secuencias del gen *tbpB* en las bacterias del género *Mannheimia* se subdividían en 2 grupos (*tbpB1* y *tbpB2*), mientras que las secuencias del gen *tbpB* de *B. trehalosi* representaban un único grupo homogéneo (subtipo *tbpB3*).

Se observó además que los dos grupos de los aislados de *Mannheimia* tenían relación con el serotipo capsular identificado. Así en el primer grupo se podían incluir las secuencias del gen *tbpB* de todos los serotipos de *M. haemolytica* descritos, incluido el A2 (subtipo *tbpB1*), mientras que en el segundo grupo solo se observaron secuencias del gen *tbpB* de aislados del serotipo A2 (subtipo *tbpB2*). Teniendo en cuenta estos resultados se diseñaron tres cebadores, TBPB1, TBPB2 y TBPB3, para la detección por PCR de cada uno de los subtipos del gen *tbpB* (Figura 22).

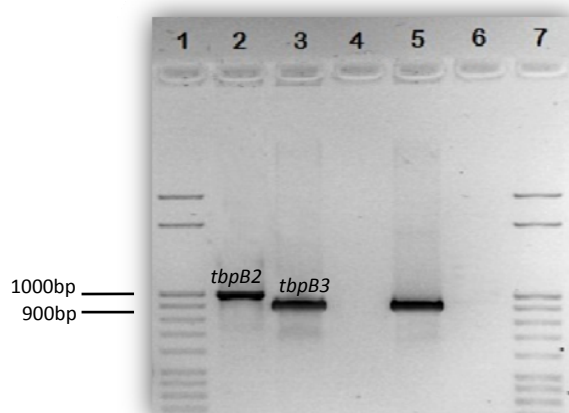


Figura 22: PCR múltiple de identificación de factores de virulencia – FV2 (genes *tbpB2* 1046bp y *tbpB3* 933bp). Gel de agarosa al 1,5% 70V. Líneas 1 y 7: Marcador de peso molecular (3000bp), línea 2: Control positivo del gen *tbpB2* cepa de *M. haemolytica* CECT924, línea 3: control positivo del gen *tbpB3* cepa NCTC10639 de *B. trehalosi*, línea 4: control negativo, líneas 5 y 6: aislados de campo del Complejo *M-B*.

En la tabla 44 se muestran los resultados de detección de los tres subtipos del gen *tbpB*. El 78,7% (384/488) de los aislados fue positivo al subtipo *tbpB1*, el 13,9% (68/488) al subtipo *tbpB2* y solo el aislado de *B. trehalosi* fue positivo al subtipo *tbpB3*. El subtipo *tbpB1* se detectó en aislados de todos los serotipos de *Mannheimia* de este estudio, mientras que el subtipo *tbpB2* se detectó mayoritariamente en aislados de los serotipos A2 y A7 o no tipificables. El subtipo *tbpB3* se detectó exclusivamente en el único aislado de *B. trehalosi* obtenido en este estudio.

Tabla 44: Resultados de la PCR de detección de los tres subtipos del gen *tbpB* en los aislados de *Mannheimia* y *B. trehalosi* por serotipos.

Bacteria	SEROTIPO	PCR <i>tbpB</i> / Nº (%)				TOTAL (N=488)
		Negativas (n=35)	<i>tbpB1</i> (n=384)	<i>tbpB2</i> (n=68)	<i>tbpB3</i> (n=1)	
<i>Mannheimia</i>	A1	1 (2,9)	14 (3,6)	0 (0)	0 (0)	15 (3,1)
	A2	0 (0)	10 (2,6)	13 (19,1)	0 (0)	23 (4,79)
	A5	0 (0)	30 (7,8)	2 (2,9)	0 (0)	32 (6,6)
	A6	2 (5,7)	48 (12,5)	1 (1,5)	0 (0)	51 (10,5)
	A7	17 (48,6)	35 (9,1)	10 (14,7)	0 (0)	62 (12,7)
	A8	1 (2,9)	22 (5,7)	0 (0)	0 (0)	23 (4,7)
	A9	0 (0)	40 (10,4)	1 (1,5)	0 (0)	41 (8,4)
	A11	2 (5,7)	1 (0,3)	0 (0)	0 (0)	3 (0,6)
	A12	0 (0)	38 (9,9)	0 (0)	0 (0)	38 (7,8)
	A13	0 (0)	8 (2,1)	0 (0)	0 (0)	8 (1,6)
	A14	0 (0)	1 (0,3)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
	A17	0 (0)	5 (1,3)	1 (1,5)	0 (0)	6 (1,2)
	NT	12 (34,3)	132 (34,4)	40 (58,8)	0 (0)	184 (37,7)
<i>B. trehalosi</i>	NT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1

El sistema Tbp es un sistema de captación de hierro dependiente de TonB, el cual actúa como una fuente de energía para promover la captación de hierro de la superficie externa de la célula blanco. En otras especies de *Pasteurellaceae* se ha observado que el sistema Tbp exhibe una estricta especificidad de especie, siendo capaz de unirse a la transferrina solo del hospedador natural (Jacques y Mikael, 2002). Un ejemplo de ello, es el sistema Tbp de *Actinobacillus pleuropneumoniae* el cual ha demostrado unirse solo a la transferrina de porcinos pero no a la de bovinos y ovinos (Kirby *et al.*, 1995).

En nuestro estudio el tipo 2 del gen *tbpB* se asoció a los serotipos A2 y A7, los que se consideran los más frecuentes en la pasteurelosis neumónica ovina. No obstante, aislados del serotipo A7 presentaron subtipos distintos, *tbpB1* y *tbpB2*, indicando una vez más la heterogeneidad de los aislados de este serotipo.

Un estudio realizado por Lo *et al.* (2006) determinó la expresión de genes asociados a la virulencia en lavados traqueales de bovinos vacunados y desafiados con *M. haemolytica* A1, a través de técnicas de PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR). El estudio revela que la expresión del gen *tbpB* varió con el estadio de la infección por *M.*

haemolytica, siendo posible su expresión en etapas tempranas de la infección, cuando las células bacterianas se están dividiendo activamente y, por tanto, requieren una continua fuente de hierro, mientras que en etapas finales de la infección las bacterias pueden ser metabólicamente inactivas y, por tanto, no requerir hierro. Además, aparentemente la expresión del gen *tbpB* fue mayor en animales con una puntuación alta de neumonía (Lo *et al.*, 2006).

V.9.2.4. Determinación de los perfiles genéticos

Los aislados se agruparon en perfiles genéticos de acuerdo a los resultados de las PCR's de detección de los 16 genes de virulencia estudiados (Tabla 45). Los perfiles genéticos se determinaron identificando los genes estudiados con combinaciones de los números 0 y 1, el 0 representa a los genes no detectados y el 1 a los genes detectados. El 81,6% de los aislados se agruparon en 23 perfiles genéticos distintos (Tabla 45). Los números 24 y 25 (Tabla 45) agrupan los perfiles presentes solo en 2 y 1 aislados, respectivamente, y que se detallan en el anexo I.

El 24,2% (118/488) de los aislados presentaba el perfil nº 1 (1011101111111111), perfil que identifica a los aislados positivos a los genes *lktA*, *gcp*, *sodA*, *pomA*, *hf*, *plpD*, *lpsA*, *pilA*, *adhes*, *tbpB*, *nanH*, *tonB*, *tbpA* y *fhaC* pero negativas a los genes *irp* y *sodC*, mientras que, el 17,2% (84/488) presentaba el perfil nº 2 (1111101111111111) que identifica a los aislados positivos a todos los factores de virulencia con excepción del gen *sodC*.

Los resultados de los perfiles genéticos en función de las especies del complejo *M-B* se resumen en la tabla 46. Los perfiles mayoritarios 1 y 2 se detectaron exclusivamente en aislados de *M. haemolytica*. Los aislados de *M. ruminalis* presentaron los perfiles 13 y 18 que se corresponden con perfiles en los que se detectó el menor número de factores de virulencia.

Tabla 45: Perfiles genéticos en aislados del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia* basados en la detección de genes de virulencia.

Nº	Factores de virulencia estudiados en aislados del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> (n=488)																Perfil genético*	Frecuencia (Nº)	Porcentaje (%)
	<i>lktA</i>	<i>irp</i>	<i>gcp</i>	<i>sodA</i>	<i>pomA</i>	<i>sodC</i>	<i>hf</i>	<i>plpD</i>	<i>lpsA</i>	<i>pilA</i>	<i>adhes</i>	<i>tbpB</i>	<i>nanH</i>	<i>tonB</i>	<i>tbpA</i>	<i>fhaC</i>			
1	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1011101111111111	118	24,2
2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1111101111111111	84	17,2
3	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1111100111111111	43	8,8
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1111111101111111	31	6,4
5	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1101101101111111	27	5,5
6	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1101111101111111	13	2,7
7	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1011100111111110	10	2,0
8	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1010101111111111	7	1,4
9	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1110101111111111	7	1,4
10	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1111100111111110	7	1,4
11	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	1001000001011111	6	1,2
12	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1111100101111111	6	1,2
13	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0001000001000000	5	1,0
14	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1101100101111111	5	1,0
15	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1101110101111111	5	1,0
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1111111111111111	5	1,0
17	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1001001111111111	3	0,6
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0000000001000000	3	0,6
19	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1011100111111111	3	0,6
20	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	1110101111110111	3	0,6
21	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1111011101111111	3	0,6
22	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1111101001111111	3	0,6
23	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1111110101111111	3	0,6
24	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Perfiles variables (2) ^o	14 (2)	5,8 (0,4)
25	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Perfiles variables (1) ^b	60 (1)	12,6 (0,2)

*Perfiles genéticos con una frecuencia de presentación ≥ 3 . ^a 14 perfiles genéticos distintos que solo se presentaron en dos aislados. ^b 60 perfiles genéticos distintos que solo se presentaron en un aislado. V Variable. ** La descripción de los perfiles genéticos con frecuencia ≤ 2 se resumen en el anexo

Tabla 46: Frecuencia de perfiles genéticos en cada uno de las bacterias del Complejo *M-B* identificadas

Nº	Perfil genético*	Total de aislados (N =488)		<i>M. haemolytica</i> (N=456)		<i>M. glucosida</i> (N= 17)		<i>M. ruminalis</i> (N=12)		<i>M. varigena</i> (N=2)		<i>B. trehalosi</i> (N=1)	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	1011101111111111	118	24,2	118	25,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
2	1111101111111111	84	17,2	84	18,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
3	1111100111111111	43	8,8	43	9,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
4	1111111011111111	31	6,4	30	6,6	1	5,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
5	1101101101111111	27	5,5	26	5,7	1	5,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
6	1101111101111111	13	2,7	13	2,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
7	1011100111111110	10	2,0	10	2,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
8	1010101111111111	7	1,4	7	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
9	1110101111111111	7	1,4	7	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10	1111100111111110	7	1,4	7	1,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
11	1001000001011111	6	1,2	5	1,1	1	5,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
12	1111100101111111	6	1,2	6	1,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
13	0001000001000000	5	1,0	3	0,7	0	0,0	2	16,7	0	0,0	0	0,0
14	1101100101111111	5	1,0	5	1,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
15	1101110101111111	5	1,0	5	1,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
16	1111111111111111	5	1,0	5	1,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
17	1001001111111111	3	0,6	3	0,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
18	0000000001000000	3	0,6	1	0,2	0	0,0	2	16,7	0	0,0	0	0,0
19	1011100111111111	3	0,6	3	0,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
20	1110101111110111	3	0,6	1	0,2	2	11,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0
21	1111011101111111	3	0,6	3	0,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
22	1111101001111111	3	0,6	3	0,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
23	1111110101111111	3	0,6	3	0,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
24	Perfiles variables (2) ^a	13 (2)	5,2 (0,4)	13 (2)	10,4 (0,8)	3 (2)	35,4 (11,8)	0 (2)	0,0 (0)	0 (2)	0,0 (0)	0 (2)	0,0 (0)
25	Perfiles variables (1) ^b	60 (1)	12,6 (0,2)	40 (1)	16,0 (0,4)	9 (1)	53,1 (5,9)	8 (1)	66,4 (8,3)	2 (1)	50,0 (25,0)	1 (1)	100 (100)

V.10. TIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA*

V.10.1. Determinación de la subespecie y biotipos de *P. multocida*

Los aislados identificados como *P. multocida* por la prueba de PCR fueron evaluados para determinar la subespecie en base a la fermentación de los azúcares sorbitol y dulcitol. Se evaluaron un total de 87 aislados de *P. multocida*, el 35,6% (31/87) fue clasificado como subespecie *multocida* y el 64,4% (56/87) clasificado como subespecie *septica* (Tabla 47).

La determinación del biotipo de los 87 aislados clasificados como *P. multocida* se detectó con el uso de pruebas bioquímicas convencionales en medios de cultivo. La utilización de los resultados del sistema VITEK® se desestimó debido a la variabilidad de los resultados encontrados, además el tiempo de incubación de las bacterias en las tarjetas VITEK® varía entre 6 a 8 horas pudiendo llevar a lecturas erróneas. De los 14 biotipos de *P. multocida* descritos hasta el momento, se identificaron los biotipos 1, 4, 6, 7 y 10 (Tabla 47). Adicionalmente se pudieron detectar 10 biotipos nuevos, clasificados del 15 al 24.

El biotipo más frecuente entre los aislados de este estudio fue el biotipo 19 con un 34,5% (30/87) asociado a los aislados de la subespecie *P. multocida septica*, seguido del biotipo 4 con un 21,80% (19/87) asociado a la subespecie *P. multocida multocida* y el biotipo 6 con un 13,80% (12/87) asociado a la subespecie *P. multocida septica* (Tabla 47). Los biotipos 17, 18, 20, 22 solo se encontraron en un aislado cada uno 1,1% (1/87) (tabla 47). Las características bioquímicas de los nuevos biotipos se describen en la Tabla 48.

Tabla 47: Subespecie, biotipos y serotipo capsular de 87 aislados de *P. multocida*.

Subespecie	Biotipo	Pruebas bioquímicas									Serotipo capsular			<i>P. multocida</i>	
		Ureasa	ODC	Arabinosa	Dulcitol	Maltosa	Sorbitol	Trealosa	Xilosa	Lactosa	A n=55	D n=31	CAP – n=3	n=87	%
<i>multocida</i> (n=31)	1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2	1	0	3	3,40
	4	-	+	-	-	-	+	+	-	-	0	19 ^a	0	19	21,80 ^b
	15	-	+	-	-	+	+	+	-	-	0	3	0	3	3,40
	16	-	+	+	-	-	+	+	-	-	0	4	0	4	4,60
	17	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0	0	1	1	1,10
	18	-	-	-	-	-	+	+	-	-	0	1	0	1	1,10
Total subespecie											2	28 ^a	1		
<i>septica</i> (n=56)	6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	12 ^a	0	0	12	13,80
	7	-	+	-	-	-	-	+	+	-	2	0	0	2	2,30
	10	-	+	-	-	+	-	+	+	-	1	0	0	1	1,10
	19	-	+	-	-	-	-	-	-	-	27 ^a	2	1	30	34,50 ^b
	20	-	+	-	-	+	-	-	-	-	0	1	0	1	1,10
	21	-	+	-	-	+	-	+	-	-	1	0	1	2	2,30
	22	-	+	+	-	-	-	+	-	-	1	0	0	1	1,10
	23	-	+	-	-	-	-	+	-	-	5	0	0	5	5,70
	24	-	-	-	-	+	-	+	-	-	2	0	0	2	2,30
Total subespecie											51 ^a	3	2		

^a Diferencias estadísticamente significativas por columnas (P< 0.000) Test exacto Fisher. ^b diferencias estadísticamente significativas por filas (P< 0.000)

Tabla 48: Características de los nuevos biotipos de *P. multocida* descritos en los aislados obtenidos a partir de pulmones de corderos.

Propiedades bioquímicas	Características de los nuevos biovares de <i>P. multocida</i> descritos									
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Producción de ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Producción de ácido a partir de:										
Arabinosa	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Trealosa	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Subespecie de <i>P. multocida</i>	<i>multocida</i> , negativo a xilosa	<i>multocida</i> , negativo a xilosa	<i>multocida</i> , ODC negativa	<i>multocida</i> , ODC negativa	<i>septica</i> , negativa a azúcares	<i>septica</i> , negativo a xilosa	<i>septica</i>	<i>septica</i> , positivo a arabinosa	<i>septica</i> , ODC negativa	<i>septica</i> , ODC negativa

*Todos los aislados fueron oxidasa (+), catalasa (+), indol (+), glucosa (+), manitol (+), β-galactosidasa (-), no hemolíticos y no crecieron en agar Mac Conkey.

En la actualidad existen estudios, donde se evidencia que las características fenotípicas de *P. multocida* también pueden ser variables, como sucede en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Variaciones para las pruebas de manitol, ODC, sorbitol y sucrosa se han observado en otros estudios (Christensen *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2005). Adicionalmente, también han encontrado variantes maltosa positivas en aislados de *P. multocida*. La capacidad de fermentar maltosa es considerada una característica esencial para clasificar los aislados (Petersen *et al.*, 1998).

La subespecie séptica ha sido reportada en vacas (Bisgaard *et al.*, 1991) y en pollos (Snipes *et al.*, 1990; Fegan *et al.*, 1995). Estudios fenotípicos de *P. multocida* han evidenciado que en pequeños rumiantes existe una alta prevalencia de aislados de *P. multocida* subespecie *septica* (Shayegh *et al.*, 2008; Shayegh *et al.*, 2009). Aunque, estudios realizados en aislados de *P. multocida* obtenidos de varias especies demostraron tener una baja prevalencia de esta subespecie (Ekundayo *et al.*, 2008). El método para determinar subespecie en base a la fermentación de sorbitol y dulcitol no siempre se corresponde con las pruebas genéticas (Kuhnert *et al.*, 2000; Davies, 2004; Dey *et al.*, 2007).

Un estudio filogenético sobre variantes de *P. multocida*, mostró que las variantes fenotípicas de *P. multocida* compartían al menos 98,5% de similitud con las secuencias del 16S ARN ribosomal de subespecies reconocidas (Kuhnert *et al.*, 2000). Al momento, de realizar la genotipificación de aislados de *P. multocida*, muchas veces no existe correspondencia con la subespecie encontrada a nivel de fenotipo. Christensen *et al.* (2004) realizaron la secuenciación del 16S ARN ribosomal de algunos aislados de *P. multocida*, encontrando que aislados que fueron identificados fenotípicamente como *P. multocida* subespecie *septica*, mostraron una alta similitud genotípica con aislados de *P. multocida* subespecie *multocida* y *P. multocida* subespecie *gallicida*, mientras que la relación genotípica con *P. multocida* subespecie *septica* fue distante. Por lo que, la presencia de variantes negativas a sorbitol puede llevar a una identificación errónea de *P. multocida* subespecie *septica*, cuando la caracterización de los aislados solo se realiza en base a caracteres fenotípicos (Christensen *et al.*, 2004). Desde que los estudios fenotípicos muestran una gran variación entre los diferentes

aislados, investigaciones basadas en análisis genéticos son necesarias para confirmar los resultados.

El biotipo más común entre nuestros aislados fue el 19 que se caracterizó por ser negativo a la fermentación de azúcares. De los 30 aislados del biotipo 19, 27 pertenecieron al serogrupo A, encontrando una asociación estadística significativa entre ambas características. El segundo biotipo más común fue el 4. Los 19 aislados del biotipo 4 (100%) pertenecieron al serogrupo D.

Se han reportado variaciones en los fenotipos dentro de cada subespecie de *P. multocida*. Fegan *et al.* (1995) asignaron cinco biotipos dentro de la subespecie *multocida*, dos dentro de la subespecie *septica* y uno dentro de la subespecie *gallicida*, pero otros dos biotipos no pudieron ser asignados dentro de ninguna de las subespecies de *P. multocida* reconocidas (Fegan *et al.*, 1995). Blackall *et al.* (1998) comprobaron que el genotipo de estos biovares estaban relacionados con *P. multocida*, aunque no pudieron ser clasificados dentro de ninguna de las subespecies (Blackall *et al.*, 1998).

V.10.2. Serogrupos de los aislados de *Pasteurella multocida*

Se determinó el serogrupo capsular de los 87 aislados identificados como *P. multocida* mediante la técnica de PCR múltiple desarrollada por Townsend *et al.* (1999). La PCR identifica los cinco serogrupos capsulares descritos: A, B, D, E y F (Figura 23). Los aislados fueron clasificados en dos serogrupos capsulares principalmente, los serogrupos A y D (Tabla 47). El 60.9% (53/87) fue identificado como serogrupo A, el 35,6% (31/87) identificado como serogrupo D y el 3,4% (3/87) fue negativo a los cinco serogrupos (CAP-).

Al estudiar la asociación del serogrupo capsular con la subespecie se encontró una asociación estadística significativa ($p < 0,000001$) entre el serogrupo capsular y la subespecie identificada, asociándose el serogrupo A con la subespecie *septica* y el serogrupo D con la subespecie *multocida* (Tabla 47). También se encontró una

asociación entre el serogrupo capsular y el biotipo (Tabla 47). El serogrupo D se asoció al biotipo 4 y el serogrupo A a los biotipos 6 y 19 (Tabla 47).

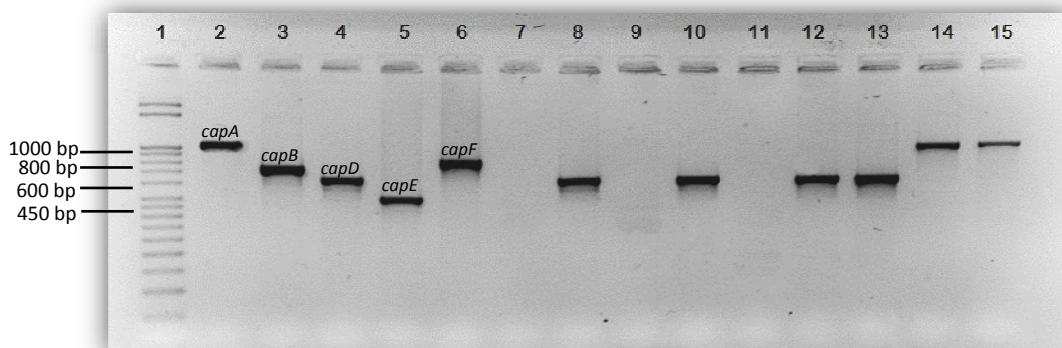


Figura 23: PCR múltiple de identificación de serogrupos capsulares de *P. multocida* (*capA* 1044 bp, *capB* 760 bp, *capD* 657 bp, *capE* 511 bp y *capF* 851 bp). Gel de agarosa al 2%. Línea 1: Marcador de peso molecular (3000bp), línea 2: Control positivo serogrupo A (NCTC10322), línea 3: Control positivo serogrupo B (NCTC10323), línea 4: control positivo serogrupo D (CECT4325), línea 5: control positivo serogrupo E (NCTC10326), línea 6: control positivo serogrupo F (C2040103), línea 7: control negativo, líneas 8 – 15 aislados de campo de *P. multocida*.

Estos resultados corroboran lo encontrado por Ewers *et al.* 2006, quienes determinaron que el serogrupo más frecuente encontrado en aislados de pequeños rumiantes fue el serogrupo A (69,2%), seguido del serogrupo D (30,8%)(Ewers *et al.*, 2006). Otros investigadores indican que en pequeños rumiantes la gran mayoría de aislados son del serogrupo A (Fussing *et al.*, 1999; Weiser *et al.*, 2003). Ewers *et al.* (2006) encontraron que el 4,9% fueron negativos a la presencia de cápsula (CAP-) (Ewers *et al.*, 2006).

Aunque la caracterización del serotipo de *P. multocida* se hace en base a la identificación del antígeno somático y el antígeno capsular, actualmente ninguna técnica de diagnóstico molecular ha sustituido al tradicional método de difusión en agar gel (Namioka y Murata, 1961) para identificar el antígeno somático, mientras que el método tradicional de hemaglutinación indirecta (Carter, 1955, 1962) para la tipificación del antígeno capsular ha sido sustituida por la PCR múltiple descrita por Townsend (Townsend *et al.*, 1998). Debido a lo laborioso que resulta la tipificación del

antígeno somático, los investigadores a menudo solo realizan la tipificación capsular (Dziva *et al.*, 2008).

V.10.3. Detección de los genes *tox*A, *pfh*A, *hgb*B y *tbp*A codificantes de factores de virulencia de *P. multocida*.

Cuatro principales factores asociados a la virulencia de *P. multocida* fueron identificados a través de la detección de sus genes codificantes (*tox*A, *pfh*A, *hgb*B y *tbp*A) con la PCR múltiple desarrollada por Atashpaz *et al.* (2001) (Figura 24). El gen *tox*A codifica la toxina dermonecrótica de *P. multocida*, el gen *pfh*A codifica una proteína asociada a la adhesión de *P. multocida* a la célula hospedera y los genes *tbp*A y *hgb*B están involucrados en el sistema de adquisición de hierro.

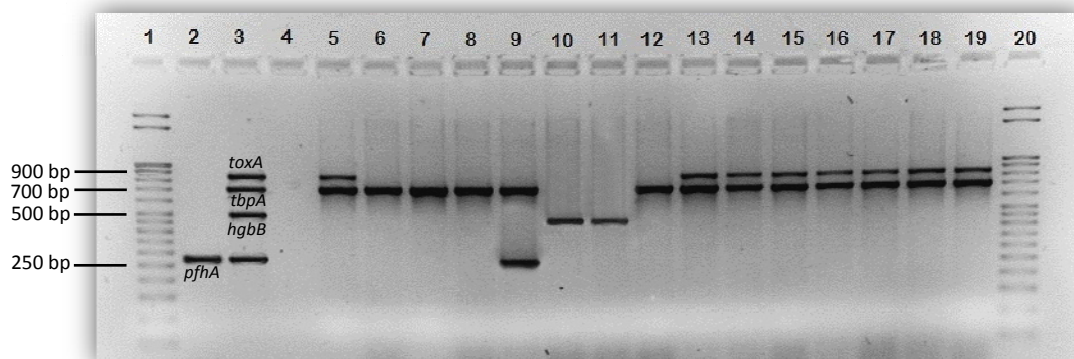


Figura 24: PCR múltiple de identificación de genes de virulencia (*tox*A 865bp, *tbp*A 728bp, *hgb*B 500bp y *pfh*A 276bp) de *P. multocida*. Gel de agarosa al 1,5%. Líneas 1 y 20: marcador molecular (3000bp), línea 2: Control positivo de gen *pfh*A (NCTC10322), línea 3: control positivo de los genes *tox*A, *tbp*A, *hgb*B y *pfh*A (CECT4325), línea 4: control negativo, líneas 5 -19: aislados de campo de *P. multocida*.

La mayoría de los aislados fueron positivos a la presencia del gen *tox*A (75,9%) y al gen *tbp*A (97,7%) (Tabla 49). Solo el 9,2% (8/87) de los aislados fue positivo al gen *pfh*A y el 2,3% (2/87) al gen *hgb*B (Tabla 49). La presencia del gen *tox*A de la toxina se asoció al serogrupo A ($P<0,0000001$). El 92,5% de los aislados del serogrupo A fue positivo, aunque también se detectó aproximadamente en la mitad (51,6%) de los aislados del

serogrupo D. Los dos únicos aislados que fueron positivos al gen *hgbB* fueron también los únicos aislados negativos al gen *tbpA* y eran CAP- (Tabla 50).

Tabla 49: Distribución de los factores de virulencia de acuerdo a los serotipos capsulares entre los 87 aislados de *P. multocida*.

Gen de virulencia ^a	Total de Positivos (% de 87)	Nº (%) de FV's en los serotipos capsulares		
		A (n=53)	D (n=31)	CAP(-) (n=3)
<i>toxA</i>	66 (75,9)	49 (92,5)*	16 (51,6)	1 (33,3)
<i>pfhA</i>	8 (9,2)	4 (7,5)	2 (6,5)	2 (66,7)
<i>tbpA</i>	85 (97,7)	53 (100)	31 (100)	1 (33,3)
<i>hgbB</i>	2 (2,3)	0	0	2 (66,7)

^a Todos los genes fueron detectados por PCR. * Diferencia estadísticas significativas al 95% de confianza.

Los aislados se agruparon en cinco perfiles genéticos (0011, 0100, 0101, 1100 y 1101) de acuerdo a la presencia o ausencia de los genes de virulencia estudiados (Tabla 50). El perfil genético más frecuente (71,3%) fue el 1100 que se corresponde con los aislados positivos a los genes *toxA* y *tbpA* pero negativos a los genes *hgbB* y *pfhA* (Tabla 50). Este genotipo se asoció al serotipo capsular A y la subespecie *P. multocida septica*. El otro genotipo más frecuente (18,4%) fue el 0100 que se corresponde con los aislados positivos al gen *tbpA* y negativos a los otros tres. Este genotipo se asoció al serotipo capsular D y a la subespecie *P. multocida multocida* (Tabla 50). Estos dos genotipos agruparon prácticamente el 90% de los aislados.

Algunos estudios han reportado que el número de factores de virulencia se correlacionan con los mecanismos de patogenicidad de *P. multocida* (Hunt *et al.*, 2000; Harper *et al.*, 2006). Ewers *et al.* (2006) determinaron que los genes *toxA*, *tbpA* *hgbB* y *pfhA* podrían ser importantes marcadores genéticos para definir el potencial patógeno de cepas de *P. multocida* (Ewers *et al.*, 2006), por ello fueron evaluados en este estudio.

Tabla 50: Asociación entre los perfiles genéticos (genes de virulencia) y el serotipo capsular y la subespecie de *P. multocida*.

Perfiles genéticos	Genes de virulencia				Serotipo Capsular (Nº/%)			Subespecie (Nº/%)		<i>P. multocida</i>	
	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>hgbB</i>	<i>pfhA</i>	A	D	CAP-	<i>multocida</i>	<i>séptica</i>	N=87	%
0011	-	-	+	+	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	2	2,3
0100	-	+	-	-	4 (25,0)	12 (75,0)	0 (0,0)	12 (75,0)	4 (25,0)	16	18,4
0101	-	+	-	+	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2	2,3
1100	+	+	-	-	45 (72,6)*	16 (25,8)	1 (1,6)	15 (24,2)	47 (75,8)*	62	71,3
1101	+	+	-	+	4 (80,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	4 (80,0)	5	5,7

*Diferencia estadística significativa al 95% de confianza.

El gen *toxA* es frecuentemente detectado en aislados de *P. multocida* del serotipo D obtenidos de cerdos y es generalmente aceptado que las cepas toxigénicas de *P. multocida* se asocian a la etiología de la rinitis atrófica porcina. Sorprendentemente se detectó una alta frecuencia de aislados *toxA*⁺ en este estudio. Ewers *et al.*, (2006) también encontraron un elevado número de aislados de *P. multocida* de ovinos *toxA*⁺ (66,7%), mientras que en cerdos el porcentaje de detección del gen *toxA* es menor al 5% (Tang *et al.*, 2009).

En nuestro estudio la presencia del gen *toxA* se asoció al serotipo A, aunque también fue frecuente en el D lo que difiere de lo encontrado por la otros de investigadores (Ewers *et al.*, 2006; Bethe *et al.*, 2009). El análisis de la secuencia de ADN del gen *toxA* de los serotipos A y D demostró que ambas secuencias son las mismas, independientemente del origen del aislado o del serotipo, teniendo ambas la misma capacidad de inducir rinitis atrófica en los cerdos (Nagai *et al.*, 1994). La antigenicidad de la toxina de cepas de ambos serotipos podría ser muy similar (Rimler y Brogden, 1986; Foged *et al.*, 1988).

En cerdos se ha reportado que aislados toxigénicos (*toxA*⁺) y no toxigénicos (*toxA*⁻) de *P. multocida* de los serogrupos A y D pueden causar pasteurelosis neumónica (Pijoan *et al.*, 1983; Djordjevic *et al.*, 1998). En cerdos las infecciones causadas por cepas de *P. multocida* del serogrupo D son más comunes que las causadas por el serotipo A (China,

Alemania y Malasia) aunque esto podría estar relacionado con el área geográfica (Ewers *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2009).

El gen *toxA* está codificado dentro de un bacteriófago lisogénico (Pullinger *et al.*, 2004). Al parecer, existe un intercambio del fago que codifica *toxA* a través de transferencia horizontal de genes, entre cepas de distintos serotipos capsulares y de diferentes hospedadores animales (Davies, Robert *et al.*, 2003; Ewers, 2006).

El gen *pfhA* está relacionado con la adherencia de *P. multocida* a la célula blanco (Fuller *et al.*, 2000; May *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2006). PfhA es una adhesina de *P. multocida* que ha mostrado ser importante en su virulencia y es similar a la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis*. Los estudios han demostrado que existen dos copias distintas de *pfhA*, y que mutaciones en los genes codificantes pueden afectar la adherencia de la bacteria a la célula blanco, lo que podría representar que esta proteína juega un rol importante en la virulencia de *P. multocida* (Fuller *et al.*, 2000). El gen *pfhA* ha sido asociado a los serogrupos A, B, E y F (Ewers *et al.*, 2006). Sin embargo, Tang *et al.* (2009) encontró aislados del serogrupo D positivos a la presencia de este gen, aunque su prevalencia fue menor que en los aislados del serogrupo A (Tang *et al.*, 2009).

En nuestro estudio, el gen *pfhA* que codifica la hemaglutinina filamentosa tiene un bajo rango de prevalencia en las cepas de *P. multocida*. Resultados similares fueron encontrados por Ewers *et al.* (2006) donde el 6,7% de aislados de ovinos fue positivo al gen *pfhA* (Ewers *et al.*, 2006). Mientras que, Tang *et al.* (2009) detectaron el gen *pfhA* en el 15% de aislados de porcinos. Esto significa que, comparado con otras especies animales, en ovinos su presencia es menor, aunque en otras especies el porcentaje de detección también es bajo. En relación al serogrupo, no tenemos suficientes datos, pero en nuestro estudio de los 8 aislados positivos al gen *pfhA*, al menos 4 de ellos fueron del serogrupo A. Una asociación entre la presencia de *pfhA* y el serogrupo A fue observada por Bethe *et al.* (2009). Estos autores hipotetizan que la adquisición del gen *pfhA* por aislados del serogrupo D pudo darse por mecanismos de transferencia horizontal de genes, dándole a este serogrupo una ventaja para sobrevivir dentro del hospedador (Bethe *et al.*, 2009).

Es conocido que las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* necesitan de fuentes de hierro para la proliferación en la célula blanco. Bajas concentraciones de hierro libre en las membranas mucosas de los tejidos es una línea de defensa contra la infección bacteriana. La adquisición de hierro es un determinante de patogenicidad de *P. multocida* para mantener la infección dentro del hospedador (Bosch *et al.*, 2004; Montserrat *et al.*, 2004). Dos genes relacionados con la adquisición de hierro fueron analizados en este estudio: *tbpA* y *hgbB*.

Solo dos aislados en nuestro estudio fueron positivos al gen *hgbB*. Esto difiere de lo encontrado por otros investigadores donde alrededor del 73,3% de los aislados de *P. multocida* obtenidos de ovejas presentaron este gen (Ewers *et al.*, 2006), mientras que en los aislados de cerdos la frecuencia fue mayor al 80% tanto en animales enfermos como sanos (Bethe *et al.*, 2009). El resto de los aislados fue positivo al gen *tbpA* (97,7%). La detección del gen *tbpA* fue del 80% en aislados de ovinos (Ewers *et al.*, 2006). Sin embargo, Tang *et al.* (2009) encontraron que ningún aislado de porcinos fue positivo a la presencia de este gen (Tang *et al.*, 2009). En este último estudio se encontraron altos porcentajes de prevalencia de otros genes que codifican sistemas de captación de hierro como el *hgbA*, *tonB*, *exbB* y *exbD*. Esto podría suponer que en ausencia de un sistema de captación de hierro, la presencia de otros sistemas similares puede ayudar a la bacteria a suplir las deficiencias de hierro. La inactivación de los genes codificantes *hgbA* y *hgbB* no afectan la virulencia de *P. multocida* (Bosch *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2003; Bosch, *et al.*, 2004). Probablemente *P. multocida* despliegue otros sistemas captadores de hierro.

La presencia del gen *tbpA* en otros serotipos diferentes al A había sido desestimada hasta que Ewers *et al.* (2006) encontraron que el gen *tbpA* también está presente en el serotipo D. Este estudio corrobora lo encontrado por Ewers *et al.* (2006) puesto que todos los aislados de los serotipos A y D fueron positivos al gen *tbpA*.

La enfermedad en bovinos ha sido asociada a la presencia de *P. multocida* positiva a los genes *tbpA* y *pfhA* (Ewers *et al.*, 2006). Mientras que en cerdos solo el gen *toxA* se ha asociado con la presencia de enfermedad. La mayoría de los aislados de este estudio fueron positivos a los genes *toxA* y *tbpA*, lo que se corresponde con lo

encontrado por otros autores (Shayegh *et al.*, 2008). El mismo patrón ha sido visto en cabras, ambas especies animales parecen compartir las mismas cepas de *P. multocida* (Shayegh *et al.*, 2009). El rol de *tbpA* y *toxA* en estudios epidemiológicos de la neumonía ovina parece ser importante (Shayegh *et al.*, 2008).

V.11. SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

V.11.1. Sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de *Mannheimia-Bibersteinia*.

La sensibilidad a los antimicrobianos de aislados del Complejo *M-B* fue evaluado utilizando el método del Disco difusión siguiendo la norma técnica del CLSI. Se evaluó el perfil de susceptibilidad a 13 antibióticos en 490 aislados del Complejo *M-B* (Tabla 51).

Tabla 51: Porcentajes de resistencia encontrados en los aislados de campo del complejo *M-B*

Familia Antibiótica	Antimicrobiano	Potencia (ug)	Sensible		Intermedio		Resistente	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
Betalactámicos	Amoxicilina	30	483	99,0	0	0	5	1
Penicilínicos	Penicilina	5	477	97,8	5	1	6	1,2
Betalactámicos	Amoxicilina + Ac.	30+15	483	99,0	4	0,8	1	0,2
Clavámicos	Clavulónico							
Betalactámicos	Ceftiofur	30	481	98,6	3	0,6	4	0,8
Cefalosporínicos	Cefquinome	30	482	98,8	2	0,4	4	0,8
Tetraciclinas	Doxiciclina	80	474	97,1	9	1,8	5	1
	Tetraciclina	30	462	94,7	5	1	21	4,3
Quinolonas	Enrofloxacino	10	482	98,8	1	0,2	5	1
Macrólidos	Eritromicina	78	212	43,5	179	36,7	97	19,8
	Tilosina	150	19	3,9	28	5,7	441	90,4
Fenicoles	Florfenicol	30	488	0	0	0	0	0
Aminoglucósidos	Gentamicina	10	380	77,9	91	18,6	17	3,5
Lincosamida+	Lincomicina+	15+200	485	99,4	3	0,6	0	0
Aminoglucósido	Espectinomina							

Los porcentajes de resistencia más frecuentemente encontrados fueron a tilosina 90,4% (441/488) y a eritromicina 19,8% (97/488). Menos del 10% de los aislados fue resistente a tetraciclina 4,3% (21/488), gentamicina 3,5% (17/488), penicilina 1,2% (6/488), amoxicilina, doxiciclina y enrofloxacino 1% (5/488), ceftiofur y cefquinome

0,8% (4/488) y amoxicilina + ac. clavulónico 0,2% (1/488) (Tabla 51). No se detectaron resistencias a florfenicol y a la combinación de Lincosamida + espectinomina.

En la Tabla 52 se muestran los fenotipos de resistencia detectados en las especie del complejo *Mannheimia-Bibersteinia*. Los 7 aislados resistentes de *M. ruminalis* lo fueron a la tilosina. Los 15 aislados resistentes de *M. glucosida* presentaron varias resistencias y en todas se incluyó la resistencia a la tilosina. En la tabla 53 se muestran el número de resistencias detectadas por especie. Se consideró aislado multirresistente a los que presentaron resistencia a tres o más antibióticos de diferente familia. Se encontraron 5 aislados multirresistentes

Tabla 52: Fenotipos resistentes detectados en aislados de campo del Complejo *M-B**

Fenotipo resistente**	<i>M.</i> <i>haemolytica</i> (N=427)	<i>M.</i> <i>glucosida</i> (N=15)	<i>M.</i> <i>ruminalis</i> (N=7)	<i>M.</i> <i>varigena</i> (N=1)	TOTAL (N=450)
TIL	307 (71,9)	5 (33,3)	7 (100)	0 (0)	319 (70,9)
ERI, TIL	81 (19)	2 (13,3)	0 (0)	0 (0)	83 (18,4)
TET, TIL	5 (1,2)	3 (20,0)	0 (0)	1 (100)	9 (2,0)
ERI, GEN, TIL	7 (1,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (1,6)
GEN, TIL	6 (1,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (1,3)
ENRO	3 (0,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0,7)
PEN, TIL	3 (0,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0,7)
TET, ERI, TIL	2 (0,5)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)	3 (0,7)
AMOX, TIL	2 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0,4)
CEFT, CEFQ, TET, GEN	2 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0,4)
TET, DOX, ERI, TIL	1 (0,2)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)	2 (0,4)
AMOX	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
AMOX, AM+AC, CEFT, PEN, TIL	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
AMOX, PEN	0 (0)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
CEFQ, TET, TIL	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
CEFT, CEFQ, ERI, TIL	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
ENRO, TIL	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
GEN	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
TET	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
TET, DOX	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
TET, DOX, ERI, ENRO, PEN, TIL	0 (0)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)
TET, DOX, GEN, TIL	0 (0)	1 (6,7)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)

Tabla 53: Número de resistencias a los antibióticos en cada una de las especies identificadas

Nº Resistencias	<i>B. trehalosi</i> (n=1)	<i>M. glucosida</i> (n=17)	<i>M. haemolytica</i> (n=456)	<i>M. ruminalis</i> (n=12)	<i>M. varigena</i> (n=2)	TOTAL (N=488)
0	1 (100)	2 (11,8)	29 (6,4)	5 (41,7)	1 (50,0)	38 (7,8)
1	0 (0,0)	5 (29,4)	313 (68,6)	7 (58,3)	0 (0,0)	325 (66,6)
2	0 (0,0)	6 (35,3)	99 (21,7)	0 (0,0)	1 (50,0)	106 (21,7)
3	0 (0,0)	1 (5,9)	10 (2,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (2,3)
4	0 (0,0)	2 (11,8)	4 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (1,2)
5	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,2)
6	0 (0,0)	1 (5,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,2)

* No se incluye el aislado de *B. trehalosi* porque fue sensible a todos los antibióticos analizados. **AMOX: amoxicilina, AM+AC: amoxicilina+ ac. clavulónico, CEFT: ceftiofur, CEFQ: cefquinome, DOX: doxiciclina, ENRO: Enrofloxacina, ERI: eritromicina, FLOR: florfenicol, GEN: gentamicina, PEN: penicilina, TET: tetraciclina, TIL, tilosina.

La terapia antimicrobiana es una herramienta ampliamente utilizada para prevenir y controlar las infecciones clínicas (Kehrenberg *et al.*, 2001b; Brogden *et al.*, 2007). La resistencia a antibióticos en bacterias patógenas que afectan a los animales de producción son un problema mundial de salud pública (White *et al.*, 2002). Estudios previos han probado que el uso imprudente de antimicrobianos puede producir un alto riesgo de selección de bacterias resistentes y promover la diseminación de genes de resistencia localizados en plásmidos, integrones y transposones (Hunt *et al.*, 2000; Kehrenberg *et al.*, 2001b).

La sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de *M. haemolytica* procedentes de casos de neumonía en bovinos se ha determinado en otros estudios por métodos de difusión en disco (Mevius y Hartman, 2000) y midiendo su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Hormansdorfer y Bauer, 1996). En ambos casos los aislados mostraron una baja resistencia (menor al 17%) a neomicina, gentamicina, espectinomicina, polimixina B, flumequina, enrofloxacina y cloramfenicol, y alta resistencia (de 17 a 80%) a penicilina, amoxicilina, ampicilina, oxacilina, tetraciclina, tilosina, sulfametoxazol + trimetoprim, tilmicosina y estreptomicina (Watts *et al.*, 1994; Apley, 1997; Welsh *et al.*, 2004). Además aislados de *M. haemolytica* han sido altamente sensibles (100%) a ceftiofur y florfenicol (Hormansdorfer y Bauer, 1998; DeRosa *et al.*, 2000; Mevius y Hartman, 2000).

La multirresistencia antibiótica observada en aislados de *M. haemolytica* patógenos y comensales, es a menudo una resistencia adquirida a través de plásmidos y transposones. En nuestro estudio, los aislados de *M. haemolytica* aún parecen ser bastante sensibles a la mayoría de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones respiratorias en rumiantes, teniendo una baja frecuencia de aislados multirresistentes.

La alta resistencia a los macrólidos (como tilosina) en nuestros aislados debe ser tomada en cuenta en futuros tratamientos. Antibióticos de la familia de los macrólidos como la tilmicosina, son a menudo recomendados para el tratamiento de infecciones respiratorias en ovinos. Aunque, aún no se sabe si los genes que codifican la resistencia a tilosina son los mismos que codifican la resistencia a tilmicosina, se debe tener precaución en la utilización de antibióticos de esta familia en el tratamiento de infecciones por *Pasteurellaceae* en los ovinos de España.

V.11.2. Sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de *P. multocida*

La sensibilidad a los antimicrobianos de aislados de *P. multocida* fue evaluado midiendo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los 87 aislados de *P. multocida* frente a 18 antimicrobianos (Tabla 54). El 100% de los aislados fue resistente al menos a un antibiótico y 81,6% (71/87) fue multirresistente (se consideró como aislado multirresistente a los aislados que fueron resistentes a 3 o más antibióticos de diferente familia).

Los fenotipos resistentes más frecuentemente detectados fueron: clindamicina 100% (87/87), tilosina 87,4% (76/87), sulfadimetoxina 73,6% (64/87), seguido por tiamulina 31%(27/87), tilmicosina 29,9% (26/87), y oxitetraciclina 16,1% (14/87). Menos del 10% de los aislados fue resistente a penicilina 6,9% (6/87) y tulatromicina 1,1% (1/87). No se detectaron resistencias a ceftiofur, gentamicina, florfenicol, clortetraciclina, ampicilina, danofloxacino, neomicina, sulfametoxazol + trimetoprim, espectinomina y enrofloxacin (Tabla 54.).

Tabla 54: Porcentajes de resistencia encontrados en los aislados de campo de *P. multocida*

Antimicrobiano	Sensible		Intermedio		Resistente	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Ceftiofur	87	100	0	0	0	0
Gentamicina	87	100	0	0	0	0
Florfenicol	87	100	0	0	0	0
Tiamulina	60	69	0	0	27	31
Clortetraciclina	86	98,9	1	1,1	0	0
Oxitetraciclina	73	83,9	0	0	14	16,1
Penicilina	81	93,1	0	0	6	6,9
Ampicilina	87	100	0	0	0	0
Danofloxacina	87	100	0	0	0	0
Neomicina	84	96,6	3	3,4	0	0
Sulfametoxazol + Trimetoprim	87	100	0	0	0	0
Espectinomicina	87	100	0	0	0	0
Tilosina	3	3,4	8	9,2	76	87,4
Tulatromicina	85	97,7	1	1,1	1	1,1
Tilmicosina	59	67,8	2	2,3	26	29,9
Clindamicina	0	0	0	0	87	100
Sulfadimetoxina	23	26,4	0	0	64	73,6
Enrofloxacino	87	100	0	0	0	0

El fenotipo multirresistente más frecuente 20,7% (18/87) fue el resistente a tilosina, clindamicina y sulfadimetoxina (Tabla 55). La multirresistencia fue más frecuente en aislados del serogrupo A 73,6% (39/53) y en la subespecie *séptica* 73,2% (41/56). El fenotipo multirresistente más frecuente en el serogrupo A fue el resistente a tilosina, tilmicosina, clindamicina y sulfadimetoxina 16,98% (9/53), en el serogrupo D fue el fenotipo resistente a tilosina, clindamicina y sulfadimetoxina 35,48%(11/31). En la subespecie *multocida* el fenotipo multirresistente más frecuente fue a tilosina, clindamicina y sulfadimetoxina 35,48% (11/31). En la subespecie *septica* fueron dos los fenotipos más frecuentes: tilosina y clindamicina y el fenotipo tilmicosina, tilosina, clindamicina y sulfadimetoxina, ambos con 16,07% (9/56).

Tabla 55: Fenotipos resistentes encontrados en los aislados de *P. multocida*.

Fenotipo Resistente	Total de Positivos		Serotipo Capsular			Subespecie	
	Nº	(%)	A	D	CAP-	<i>multocida</i>	<i>septica</i>
CLI	2	2,3	2	0	0	0	2
CLI, SDM	2	2,3	2	0	0	0	2
OXY, CLI, SDM	3	3,4	2	1	0	1	2
OXY, PEN, CLI, SDM	1	1,1	1	0	0	0	1
OXY, TIL, CLI, SDM	1	1,1	1	0	0	0	1
OXY, TYLT, CLI, SDM	6	6,9	6	0	0	0	6
PEN, TYLT, CLI	1	1,1	1	0	0	0	1
PEN, TYLT, CLI, SDM	1	1,1	1	0	0	0	1
PEN, TYLT, TIL, CLI	1	1,1	1	0	0	1	0
PEN, TYLT, TIL, CLI, SDM	1	1,1	1	0	0	0	1
TIA, CLI	1	1,1	1	0	0	0	1
TIA, OXY, TYLT, CLI, SDM	3	3,4	2	0	1	0	3
TIA, PEN, TYLT, CLI	1	1,1	0	0	1	0	1
TIA, TYLT, CLI	1	1,1	0	1	0	1	0
TIA, TYLT, CLI, SDM	12	13,8	4	8	0	8	4
TIA, TYLT, TIL, CLI	3	3,4	2	1	0	1	2
TIA, TYLT, TIL, CLI, SDM	6	6,9	1	5	0	5	1
TIL, CLI	1	1,1	1	0	0	0	1
TYLT, CLI	10	11,5	8	2	0	1	9
TYLT, CLI, SDM	18	20,7	7	11	0	11	7
TYLT, TIL, CLI, SDM	11	12,6	9	1	1	2	9
TYLT, TUL, TIL, CLI	1	1,1	0	1	0	0	1

TIA: TIAMULINA, OXY: OXITETRACICLINA, PEN: PENICILINA, TYLT: TILOSINA, TUL: TULATROMICINA, TIL: TILMICOSINA, CLI: CLINDAMICINA, SDM: SULFADIMETOXINA.

En la Tabla 56 se indican las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) de los 18 antimicrobianos estudiados.

Diversas investigaciones han determinado que las cefalosporinas (cefazolina y ceftiofur), el florfenicol y las fluoroquinolonas (ciprofloxacino, enrofloxacino) son las drogas más activas contra *P. multocida* (Salmon *et al.*, 1995; Kehrenberg *et al.*, 2001b; Yoshimura *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009), mientras que los aminoglucósidos (kanamicina, espectinomicina, gentamicina y neomicina) muestran una pobre actividad (Gutierrez Martin y Rodriguez Ferri, 1993; Yoshimura *et al.*, 2001; Catry *et al.*, 2005b). Similares hallazgos encontramos en este estudio, excepto para los aminoglucósidos. Todos los aislados fueron sensibles a esta familia antibiótica.

Tabla 56: CMI's de los 87 aislados de *P. multocida* a los 18 antibióticos estudiados.

Antimicrobiano ^a	Nº de aislados con CMI de (ug/ml):														Punto de corte CIM (ug/ml) ^b	% Resistencia
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	2/38		
XNL		86		1											8	0
GEN				66	19	2									16	0
FFN		45	41	1											8	0
TIA						2	12	46	27						32	31
CTET			64	6	2	14	1								16	0
OXY			55	13	5			14							16	16,1
PEN	81	5		1											0,25	6,9
AMP		87													1	0
DANO	87														4	0
NEO						84	3									0
SXT														87	≤4/76	0
SPE							5	72	10						128	0
TYLT				1	2		8	50	24	2					16	87,4
TUL				65	10	4	5	1	1	1					64	1,1
TIL						54	5	2	19	7					32	29,9
CLI						2	8	70	7						4	100
SDM												23	64		512	73,6
ENRO	86	1													2	0

^a. XNL: CEFTIOFUR, GEN: GENTAMICINA, FFN: FLORFENICOL, TIA: TIAMULINA, CTET: CLORTETRACICLINA, OXY: OXITETRACICLINA, PEN: PENICILINA, AMP: AMPICILINA, DANO: DANOFLOXACINA, NEO: NEOMICINA, SXT: SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIM, SPE: ESPECTINOMICINA, TYLT: TILOSINA, TUL: TULATROMICINA, TIL: TILMICOSINA, CLI: CLINDAMICINA, SDM: SULFADIMETOXINA, ENRO: ENROFLOXACINA. ^b. Todos los valores con excepción de Tulatromicina están basados en los estándares del CLSI.

Las resistencias observadas en nuestro estudio se aproximan a los porcentajes encontrados por otros investigadores para algunos antibióticos. Tang *et al.* (2009) tuvieron porcentajes de resistencia similares a nuestros resultados en cepas de *P. multocida* aisladas de cerdos, el 98,6% fue resistente al menos a un antibiótico y el 93,1% fue clasificado como multirresistente.

Los porcentajes de resistencia para los antibióticos también fueron similares para clindamicina (80,3%) y tilmicosina (28,3%). Tampoco encontraron resistencias a ceftiofur, florfenicol y neomicina. Sin embargo, difieren en los porcentajes de resistencia para sulfametoxazol+trimetoprim (74,2%), clortetraciclina (65,2%), tetraciclina (58%), gentamicina (13,7%) y espectinomicina (12%). No evaluaron los antibióticos: tilosina, sulfadimetoxina, tiamulina, penicilina, tulatromicina, ampicilina, danofloxacino y enrofloxacino.

En este estudio, debemos resaltar el alto porcentaje de resistencia a macrólidos en los aislados de *P. multocida*, al igual que en los aislados de *M. haemolytica*. Una emergencia de aislados resistentes a esta familia parece estar extendiéndose dentro de estos géneros. El uso indiscriminado de antibióticos de la familia de los macrólidos, a menudo indicado para el tratamiento de las infecciones respiratorias en rumiantes, podría ser una de las causas de la emergencia de estas resistencias. Al igual que en otros estudios resistencias a florfenicol y ceftiofur no se encontraron en *P. multocida* (Catry *et al.*, 2005b).

Además, los aislados del serotipo D fueron los que mayor porcentaje de multirresistencia presentaron, a diferencia de nuestro estudio, donde fueron los aislados del serotipo A los que presentaron mayor porcentaje de multirresistencia. Esta diferencia puede deberse a que en ovinos y en porcinos los serotipos más frecuentes son A y D, respectivamente. Aunque algunos autores no han encontrado ninguna asociación entre el serogrupo y la resistencia antibiótica (Kumar *et al.*, 2009).

El incremento en la incidencia de bacterias patógenas multirresistentes se ha reportado con frecuencia durante los últimos años (Kehrenberg *et al.*, 2001b; White *et al.*, 2002). Nuevas formas de *P. multocida* multirresistentes han emergido actualmente (Shivachandra *et al.*, 2004). El uso indiscriminado de los antibióticos, que se ha venido

realizando en la producción animal para el tratamiento de infecciones o como aditivos en el alimento, ha podido probablemente aumentar la presión selectiva de cepas resistentes.

Los aislados de *P. multocida* de este estudio presentaron un alto grado de multirresistencia, que podrían haber emergido debido a la presión selectiva por el mal uso de los antibióticos o debido a la presencia de transposones que medien la resistencia a drogas (Kehrenberg *et al.*, 2001b). Se ha demostrado que ciertos genes responsables de alterar la síntesis de los receptores de las drogas o por mutaciones en el 16S ARN ribosomal (Kehrenberg y Schwarz, 2005, 2007).

La emergencia de cepas resistentes a antibióticos puede ser la causa de los fallos en los tratamientos y a que muchas veces no se utiliza el medicamento adecuado. Los tratamientos inadecuados podrían seguir seleccionando microorganismos resistentes que no pueden ser eliminados. Esto produce pérdidas económicas, además de convertirse en un importante problema de salud pública al ser *P. multocida* un microorganismo que afecta a una gran variedad de especies animales e incluso al hombre (Davies *et al.*, 2004).

V.12. RESULTADOS GLOBALES DEL AISLAMIENTO EN RELACIÓN A LAS LESIONES NEUMÓNICAS

V.12.1. Frecuencia de aislamiento y asociación con la presencia de lesiones neumónicas

La frecuencia de aislamiento de miembros de la familia *Pasteurellaceae* fue alta: se aisló algún miembro de la familia en el 62,33% (164/263) de los pulmones analizados (Tabla 57). Se encontró una asociación entre el grado de consolidación pulmonar y el crecimiento bacteriano de la familia *Pasteurellaceae* (Tabla 57). La fuerza de la asociación fue mayor en los grados de consolidación 2 (OR 14,95; IC95% 3,38 – 66,18) y el 3 (14,35; IC95% 1,80 – 114,20) que en el grado 1 (2,46; IC95% 1,42 – 4,26). Considerando globalmente la presencia de lesiones neumónicas (grados 1-5) también

se observó una asociación (OR 3,56; IC95% 2,11-6,00) entre la presencia de lesiones y el crecimiento positivo de la Familia *Pasteurellaceae* (Tabla 57).

Tabla 57: Asociación del crecimiento bacteriano de la familia *Pasteurellaceae* con la presencia de lesiones neumónicas y el grado de consolidación pulmonar.

Grado de consolidación pulmonar	% del volumen pulmonar consolidado	TOTAL pulmones (N=263)	Pulmones con crecimiento Fam. <i>Pasteurellaceae</i>		OR (IC 95%)
			Positivo (n=164)	Negativo (n=99)	
0	(0)	112 (42,6)	51 (31,10)	61 (61,62)	1
1	(0,1 a 20)	107 (40,7)	72 (43,90)*	35 (35,36)	2,46 (1,42 – 4,26)
2	(20,1 a 40)	27 (10,3)	25 (15,24)*	2 (2,02)	14,95 (3,38 – 66,18)
3	(40,1 a 60)	13 (4,9)	12 (7,32)*	1 (1,01)	14,35 (1,80 – 114,20)
4	(60,1 a 80)	2 (0,8)	2 (1,22)	0 **	-
5	(80,1 a 100)	2 (0,8)	2 (1,22)	0 **	-
1-5	(0,1 a 100)	151 (57,4)	113 (68,90)*	38 (38,38)	3,56 (2,11-6,00)

*Diferencias estadísticas significativas ($P < 0,001$), **Celdas con valores nulos, por lo que no se pudo medir el valor de *P*.

Tabla 58: Frecuencia de aislamiento de distintas especies bacterianas de la Familia *Pasteurellaceae* por pulmones.

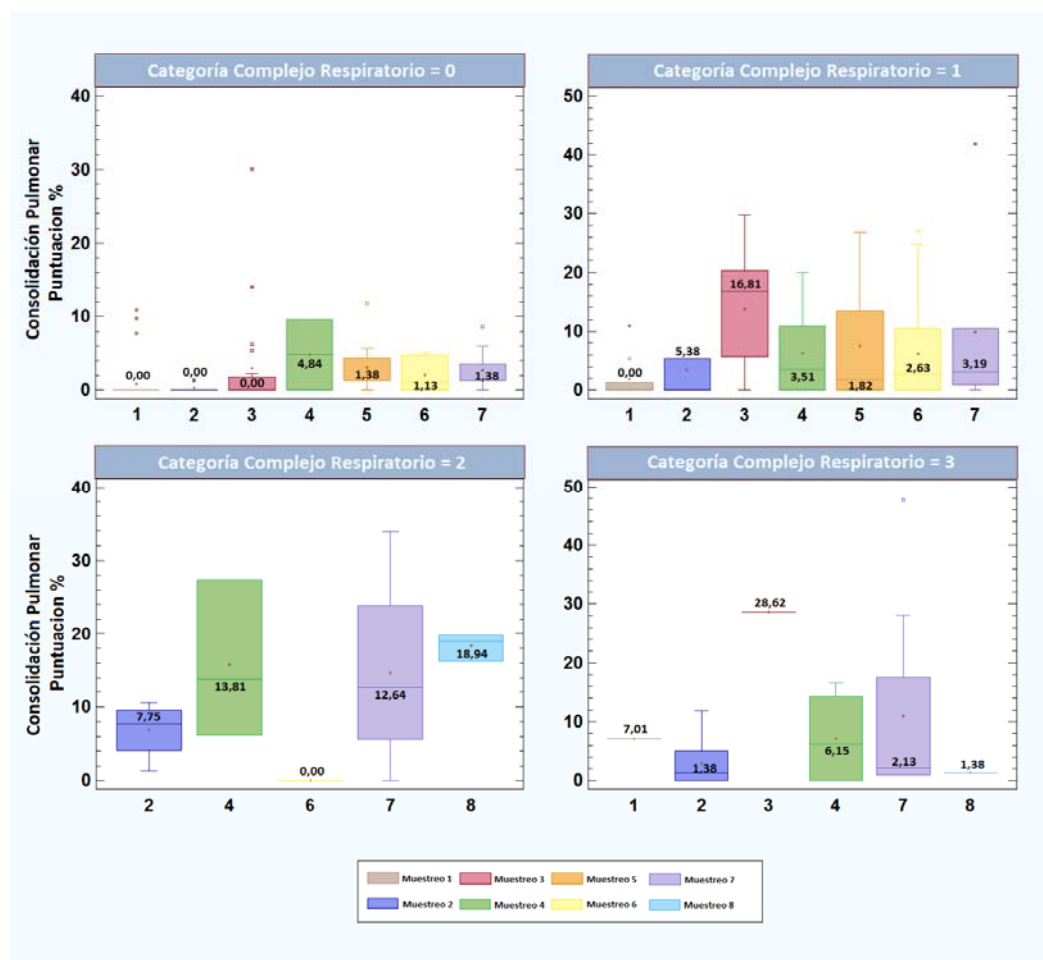
Bacteria	Pulmones positivos Nº (%)			O.R. (IC al 95%)
	TOTAL (n=263)	Con lesiones neumónicas (n=151)	Sin lesiones neumónicas (n=112)	
<i>M. haemolytica</i>	139 (52,85)	92 (60,9) ^a	47 (42,0)	2,15 (1,31-3,55)
<i>M. glucosida</i>	16 (6,08)	7 (4,7)	9 (8,0)	
<i>M. ruminalis</i>	14 (5,32)	6 (4,0)	8 (7,1)	
<i>M. varigena</i>	2 (0,76)	2 (1,3)	0 (0,0)	
<i>B. trehalosi</i>	1 (0,38)	1 (0,7)	0 (0,0)	
<i>P. multocida</i>	73 (27,76)	56 (37,09) ^b	17 (15,18)	3,29 (1,78-6,08)

^{a,b} Letras diferentes en fila denotan asociación estadística significativa ($p < 0,0023$) y ($p < 0,00008$) para *M. haemolytica* y *P. multocida* respectivamente.

De acuerdo al aislamiento bacteriano se consideraron 4 categorías dentro del Complejo Respiratorio. La categoría “0” incluye los pulmones donde no se detectó ningún miembro de la familia *Pasteurellaceae*, la categoría “1” incluye los pulmones donde solo se aislaron bacterias del género *Mannheimia*, la categoría “2” incluye los

pulmones donde solo se aisló *P. multocida* y la categoría “3” incluye pulmones donde se aislaron bacterias del género *Mannheimia* y *P. multocida* de la misma muestra.

Figura 25: Distribución de las puntuaciones de consolidación pulmonar obtenidas para cada pulmón de acuerdo al muestreo y a la categoría de complejo respiratorio.



*Números en cada “caja” representan el valor de la mediana de los datos de puntuación de consolidación pulmonar para cada muestreo

La distribución de las puntuaciones de consolidación pulmonar obtenidas para cada pulmón y como se distribuyen en cada uno de los muestreos de acuerdo a la categoría de complejo respiratorio encontrada se resumen en la Figura 25. Las medianas de puntuación del grado de consolidación pulmonar en la categoría “2” del complejo respiratorio fueron más altas en los muestreos 4 y 7. Mientras que, las medianas de

puntuación para la categoría “1” del complejo respiratorio fueron más homogéneas en todos los muestreos.

Las especies bacterianas de la Familia *Pasteurellaceae* aisladas de los pulmones analizados se resume en la Tabla 58. *M. haemolytica* se aisló en el 52,85% (139/263) de los pulmones y *P. multocida* en el 27,76% (73/263). La frecuencia de aislamiento de *M. glucosida*, *M. ruminalis*, *M. varigena* y *B. trehalosi* fue mucho menor (Tabla 58).

La frecuencia de aislamiento de bacterias del complejo *Mannheimia-Bibersteinia* por pulmones fue mucho mayor que otros estudios realizados en mataderos. Odugbo et al (2003) en un estudio realizado en ovejas al norte de Nigeria obtuvo un 25,3% (338/1335) de aislamientos positivos de la antes denominada *P. haemolytica* (Odugbo et al., 2003) y Kirkan y Kaya (2005) en un estudio realizado en Turquía, obtuvieron un 12% (24/200) de aislamiento positivos al Complejo *M-B* (Kirkan y Kaya, 2005). Diferencias entre el porcentaje de positivos al aislamiento pueden deberse a diversos factores que van desde una baja prevalencia del microorganismo en el lugar de crianza de donde proceden las muestras hasta la técnica de procesado y siembra de las muestras.

En este estudio, la mayoría de las muestras se obtuvieron entre los meses de febrero y junio de los años 2008 y 2009. La frecuencia de aislamiento de *M. haemolytica* en climas templados varía de forma estacional, siendo más prevalente durante la primavera y el inicio del verano (Gilmour y Gilmour, 1989b; Martin, 1996). En un estudio realizado por Daniel et al. 2006, las lesiones neumónicas en corderos fueron significativamente más altas en animales nacidos en primavera que en animales nacidos en otoño. La prevalencia de lesiones en pulmones puede estar asociada a factores ambientales y, por tanto, se podría reducir con sistemas de manejo adecuados (Daniel et al., 2006).

M. haemolytica y *P. multocida* son habitantes normales de la nasofaringe de los ovinos. El aislamiento de bacterias de la familia *Pasteurellaceae* de partes inferiores del tracto respiratorio en animales clínicamente sanos se ha indicado previamente en terneros (Angen et al., 2009). Por tanto, un cierto nivel de aislamiento de *M. haemolytica* y de *P. multocida* de pulmón podría ser esperable de los animales

clínicamente sanos y que no presentaban lesiones neumónicas en el momento del sacrificio. En este estudio, se encontró una asociación estadística significativa entre la presentación de lesiones neumónicas y un resultado positivo al aislamiento de *M. haemolytica* y/o *P. multocida* (Tabla 58). La frecuencia de aislamiento de *M. haemolytica* y/o *P. multocida* fue mayor en los pulmones que presentaban lesiones macroscópicas compatibles con neumonía que en los que no las presentaban con una OR de 2,15 (IC95% 1,31-3,55) y de 3,29 (IC95% 1,78-6,08), respectivamente.

La asociación de lesiones pulmonares con el aislamiento de *M. haemolytica* y *P. multocida* indica que ambas bacterias tienen un rol altamente significativo en la neumonía de los corderos (Daniel *et al.*, 2006). *M. haemolytica* y *P. multocida* producen neumonía principalmente en animales mayores de 3 meses de edad (Gilmour y Gilmour, 1989b). También se ha aislado *P. multocida* de casos de septicemia en corderos recién nacidos (Rad *et al.*, 2011).

La incidencia de Pasteurelosis debido a *P. multocida* en corderos, está generalmente asociada a neumonía, pudiendo tomar la forma septicémica en algunos casos (Watson y Davies, 2002). Está generalmente aceptado que *M. haemolytica* es el principal agente etiológico de la pasteurelosis neumónica ovina, ya que *P. multocida* ha sido infrecuentemente citada como causa de neumonía en ovinos (Odugbo *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados de este estudio indican que *P. multocida* podría contribuir significativamente a la neumonía ovina, al menos en los procesos crónicos o subagudos que originan lesiones que se observan en matadero. *P. multocida* se considera un patógeno poco común en los ovinos de Europa y EEUU y se aísla mayoritariamente de ovejas con neumonía.

En el 53,6% (141/263) de los pulmones analizados se aislaron bacterias pertenecientes al complejo *Mannheimia-Bibersteinia* (Tabla 59). En todos los pulmones positivos se aisló *M. haemolytica* en infección simple o en combinación con otros miembros del complejo, excepto en dos pulmones en los que se aisló *M. glucosida* sola o en combinación con *M. ruminalis* (Tabla 59).

Tabla 59: Combinaciones de especies del complejo *Mannheimia-Bibersteinia* por pulmones.

Nº de bacterias	Bacterias del Complejo M-B	Pulmones positivos (N =141)	
		Nº	(%)
1	<i>M. haemolytica</i>	112	79,43
	<i>M. glucosida</i>	1	0,71
2	<i>M. haemolytica</i> + <i>M. glucosida</i>	14	9,93
	<i>M. haemolytica</i> + <i>M. varigena</i>	1	0,71
	<i>M. haemolytica</i> + <i>M. ruminalis</i>	11	7,80
	<i>M. glucosida</i> + <i>M. ruminalis</i>	1	0,71
4	<i>M. haemolytica</i> + <i>B. trehalosi</i> + <i>M. glucosida</i> + <i>M. varigena</i>	1	0,71

M. glucosida también se asocia a infecciones en el tracto respiratorio inferior y rumen de ovejas, aunque también se asocia a otras lesiones (Biberstein y Gills, 1962; Angen *et al.*, 1999a; Angen *et al.*, 2002). *M. ruminalis* se aísla únicamente del rumen de ovejas y vacas (Bisgaard y Mutters, 1986; Angen *et al.*, 1999a; Angen *et al.*, 1999b) y principalmente en la forma no hemolítica, no estando asociada a ninguna enfermedad. *M. varigena* se ha asociado con neumonía, septicemia y enteritis en bovinos y porcinos (Angen *et al.*, 1997c; Angen *et al.*, 1999a). Según un estudio, *M. haemolytica*, *M. glucosida* y *M. ruminalis* se encuentran comúnmente en el tracto respiratorio inferior de ovejas sanas (Poulsen *et al.*, 2006).

V.12.2. Análisis estratificado del aislamiento de *M. haemolytica* y de *P. multocida* por muestreo.

V.12.2.1. Aislamiento de *M. haemolytica*

La frecuencia de detección de *M. haemolytica* fue relativamente alta en todos los muestreos excepto en el muestreo “1” en el que se obtuvieron mayoritariamente pulmones sin lesiones neumónicas (Tabla 60). El aislamiento no se asoció a ninguno de los muestreos lo que indica que el aislamiento no se asoció a la procedencia geográfica de los corderos. En el análisis estratificado se obtuvo una OR cruda y OR de Mantel-Haenszel (OR_{MH}) similares lo que indica que no existió confusión por muestreo (Tabla 60).

Tabla 60: Frecuencia de aislamiento y asociación con las lesiones neumónicas de *M. haemolytica* estratificado por muestreo.

Muestreo	Matadero	Provincia	Pulmones positivos/analizados			OR (IC 95%)
			Total (n=263)	Con Lesiones (n=151)	Sin lesiones (n=112)	
1	Madrid Norte	Badajoz	13/45 (28,89%)	6/9	7/36	8,28 (1,65-41,58)
2	Madrid Norte	Badajoz	33/52 (63,52%)	21/27	12/25	3,79 (1,14-12,58)
3	Colmenar Viejo	Cáceres	13/30 (43,33%)	9/14	4/16	5,4 (1,12-26,05)
4	Colmenar Viejo	Cáceres	25/30 (83,83%)	16/20	9/10	0,45 (0,04-4,6)
5	Colmenar Viejo	Cáceres	18/31 (58,06%)	13/24	5/7	0,47 (0,07-2,93)
6	Colmenar Viejo	Cáceres	19/31 (61,29%)	10/16	9/15	1,11 (0,26-4,72)
7	Getafe	Madrid	17/40 (42,5%)	16/37	1/3	1,52 (0,13-18,33)
8*	Colmenar Viejo	Madrid	1/4 (25%)	1/4	0/4	-
Total			139/263	92/151	47/112	2,25 (1,36 – 3,71)
					OR MH	2,16 (1,22 – 3,86)

*El muestreo 8 fue desestimado de la OR cruda por presentar ceros marginales.

V.12.2.2. Aislamiento de *P. multocida*

P. multocida se aisló en el 27,8% (73/263) de los pulmones analizados. No obstante, el aislamiento se asoció a los lotes de muestreo 2, 4 y 7 (Tabla 61). En el muestreo 2 se aisló *P. multocida* en el 63,5% (33/52) de los pulmones analizados y en el muestreo 7 en el 57,5% (23/40) de los pulmones analizados. En el muestreo 4 se aisló en el 30% (9/30) de los pulmones analizados. En el lote 8 solo se analizaron 4 pulmones y en todos ellos se aisló *P. multocida*. Por el contrario, en los muestreos 1, 5 y 6 la frecuencia de aislamiento de *P. multocida* fue mucho menor y varió entre el 0 y 6,5%.

En la tabla 61 se muestran los resultados del análisis estratificado de la asociación de *P. multocida* y las lesiones neumónicas. En el muestreo 1 tan solo se aisló *P. multocida* de un pulmón que presentaba lesiones. En el muestreo 6 tan solo se aisló de dos pulmones sin lesiones y de ninguno de los pulmones con lesiones. La baja frecuencia de detección no permite determinar la existencia de diferencias significativas. En el muestreo 2 se observaron diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento de pulmones neumónicos y no neumónicos (OR 5,60; IC95% 1,60-19,58). En el muestreo 4

no se encontró asociación entre el aislamiento de *P. multocida* y la presencia de lesiones neumónicas (OR 1,00; IC 95% 0,19-5,24), si bien, solo se aislaron 9 cepas.

Tabla 61: Frecuencia de aislamiento y asociación con las lesiones neumónicas de *P. multocida* estratificado por muestreo.

Muestreo	Matadero	Provincia	Pulmones positivos / analizados			OR (IC 95%)
			Total (n=263)	Con Lesiones (n=151)	Sin lesiones (n=112)	
1	Madrid Norte	Badajoz	1/45	1/9	0/36	-
2	Madrid Norte	Badajoz	33/52 ^a	22/27	11/25	5,60 (1,60-19,58)
3	Colmenar Viejo	Cáceres	1/30	1/14	0/16	-
4	Colmenar Viejo	Cáceres	9/30 ^a	6/20	3/10	1 (0,19-5,24)
5	Colmenar Viejo	Cáceres	0/31	0/24	0/7	-
6	Colmenar Viejo	Cáceres	2/31	0/16	2/15	-
7	Getafe	Madrid	23/40 ^a	22/37	1/3	2,93 (0,24-35,33)
8	Colmenar Viejo	Madrid	4/4	4/4	0/0	-
Total			73/263	56/151	17/112	3,79 (2,02-7,12) ^b
					OR MH	2,52 (1,13-5,63) ^b

^a Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$) utilizando como referencia el muestreo 1. ^b Los estratos 5 y 8 se excluyeron para el cálculo de la OR cruda y OR_{MH} por presentar ceros marginales.

En el muestreo 7 tampoco se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento de *P. multocida* de pulmones con y sin lesiones neumónicas (OR 2,93; IC 95% 0,24-35,33). No obstante, en el muestreo 7 se analizaron solo tres pulmones sin lesiones neumónicas. Los muestreos 5 y 6 se excluyeron del análisis estratificado para el cálculo de la OR cruda y la OR de Mantel-Haenszel (OR_{MH}) porque en ambos estratos había ceros marginales. En el muestreo 5 no se detectó ninguna *P. multocida* y en el 8 no se analizaron pulmones sin lesiones.

En el análisis estratificado global se obtuvo una OR_{MH} (2,52; IC95% 1,13-5,63) inferior a la OR cruda (3,79; IC95% 2,02-7,12) indicando una confusión por la variable muestreo en la asociación del aislamiento de *P. multocida* y la presencia de lesiones.

Es posible que la menor frecuencia de aislamiento de los muestreos 1, 5 y 6 refleje el nivel basal de la presencia de este microorganismo en las explotaciones de las que proceden los corderos sacrificados, mientras los picos en la frecuencia de aislamiento de los muestreos 2, 4 y 7 reflejen un episodio clínico que haya tenido lugar en la

explotación. No disponemos de los datos de los antecedentes clínicos de las explotaciones de las que procedían los corderos sacrificados en los lotes correspondientes. No obstante, la observación de los profesionales clínicos indica que la presencia de procesos respiratorios es frecuente en las explotaciones de ovino.

Algunos estudios, indican un emergente papel de *P. multocida* en la pasteurelosis neumónica de los pequeños rumiantes, al menos, en regiones con climas tropicales o subtropicales comparado con regiones con climas templados (Odugbo *et al.*, 2006). Se han reportado casos de neumonía ovina debido a *P. multocida* en Sudáfrica (Cameron *et al.*, 1978), Senegal (Doutre y Perreau, 1981), Malasia (Chandrasekaran *et al.*, 1991), Brasil (Hancock *et al.*, 1991), Arabia Saudita (Black *et al.*, 1997), Nueva Zelanda (Black, 1997), México (Viera *et al.*, 1993), Turquía (Diker *et al.*, 1994), India (Umesh *et al.*, 1994), Nigeria (Odugbo *et al.*, 2006), Edimburgo (Watson y Davies, 2002) e Irán (Rad *et al.*, 2011) Jordania (Hawari *et al.*, 2008).

En un estudio realizado en Holanda, *P. multocida* fue uno de los microorganismos más frecuentemente aislados en muestras tomadas de la cavidad nasal de ovinos enfermos comparado con los animales aparentemente sanos, mientras que *M. haemolytica* fue más frecuente en muestras de bovinos (Barbour *et al.*, 1997).

A pesar del potencial de *P. multocida* de causar pasteurelosis neumónica en los corderos, su papel ha sido en gran parte ignorado. Probablemente en los casos de campo de neumonía ovina atribuidos a *M. haemolytica* el aparente fracaso de las vacunas contra la pasteurelosis neumónica, podría deberse en parte a la implicación de *P. multocida* (Black *et al.*, 1997).

Los esfuerzos actuales por controlar la Pasteurelosis neumónica están dirigidos a prevenir las infecciones por *M. haemolytica*, por lo que la prevalencia de la neumonía por *P. multocida* podría aumentar de forma significativa con el tiempo. La infección por *P. multocida* en los pequeños rumiantes debe recibir más atención, debiéndose incluir en los programas de control y prevención de pasteurelosis neumónica en la industria ganadera (Odugbo *et al.*, 2006).

V.12.3. Características de los aislados de *M. haemolytica* y *P. multocida* por pulmones.

V.12.3.1. Características de los aislados de *M. haemolytica*

Los serotipos más frecuentes detectados en pulmones con lesiones neumónicas fueron: A7 15,9% (24/151), A6 9,3%(14/151), A12 10,6% (16/151) y A9 8,6% (13/151) (Tabla 62). En el 35,1% (53/151) de los pulmones con lesiones neumónicas se detectaron aislados no tipificables (NT) (Tabla 62). Cabe resaltar que en algunos pulmones se detectaron cepas de serotipos distintos, por lo que se denominó infección simple, cuando en la muestra se detectaron cepas del mismo serotipo e infección mixta cuando se detectaron cepas de serotipos distintos en la misma muestra. Los porcentajes de detección de cada serotipo detectados en infección simple y mixta se describen en las Figuras 26 y 27.

Tabla 62: Frecuencia de aislamiento de cada serotipo en relación al total de pulmones analizados y al total de pulmones con y sin lesiones neumónicas.

Serotipos de <i>M. haemolytica</i>	Total de pulmones analizados (N=263)	Pulmones con lesiones neumónicas (N=151)	Pulmones sin lesiones neumónicas (N=112)
A1	10 (3,8)	7 (4,6)	3 (2,7)
A2	12 (4,6)	7 (4,6)	5 (4,5)
A5	15 (5,7)	11 (7,3)	4 (3,6)
A6	27 (10,3)	14 (9,3)	13 (11,6)
A7	35 (13,3)	24 (15,9)	11 (9,8)
A8	10 (3,8)	9 (6,0)	1 (0,9)
A9	22 (8,4)	13 (8,6)	9 (8,0)
A11	1 (0,4)	1 (0,7)	0, (0,0)
A12	21 (8,0)	16 (10,6)	5 (4,5)
A13	4 (1,5)	3 (2,0)	1 (0,9)
A14	1 (0,4)	0 (0,0)	1 (0,9)
A17	6 (2,3)	4 (2,6)	2 (1,8)
NT ^a	86 (32,7)	53 (35,1)	33 (29,5)
Negativos	124 (47,15)	59 (39,07)	65 (58,03)

a. No tipificable. ^b. Pulmones en los que se detectó más de un serotipo en la misma muestra.

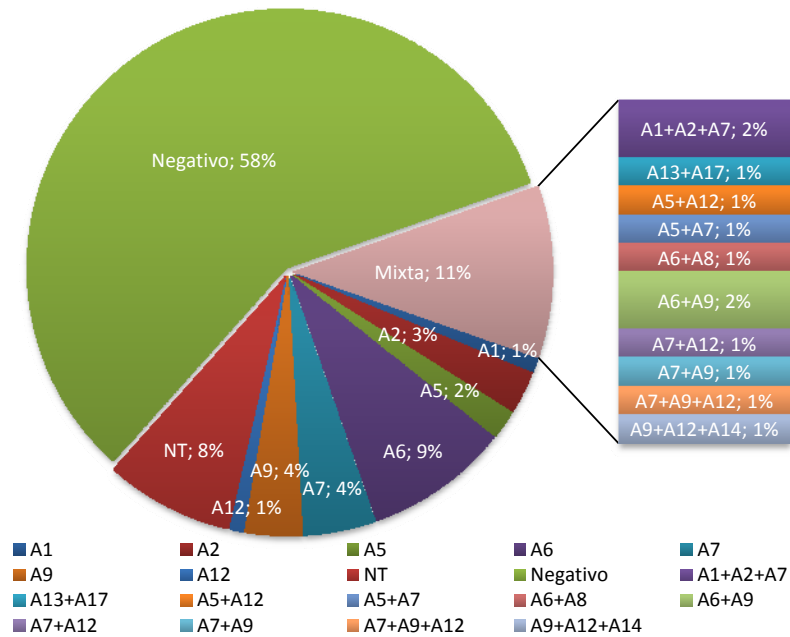


Figura 26: Frecuencia de la infección simple y mixta de serotipos de *M. haemolytica* detectados en pulmones sin lesiones neumónicas (N=112).

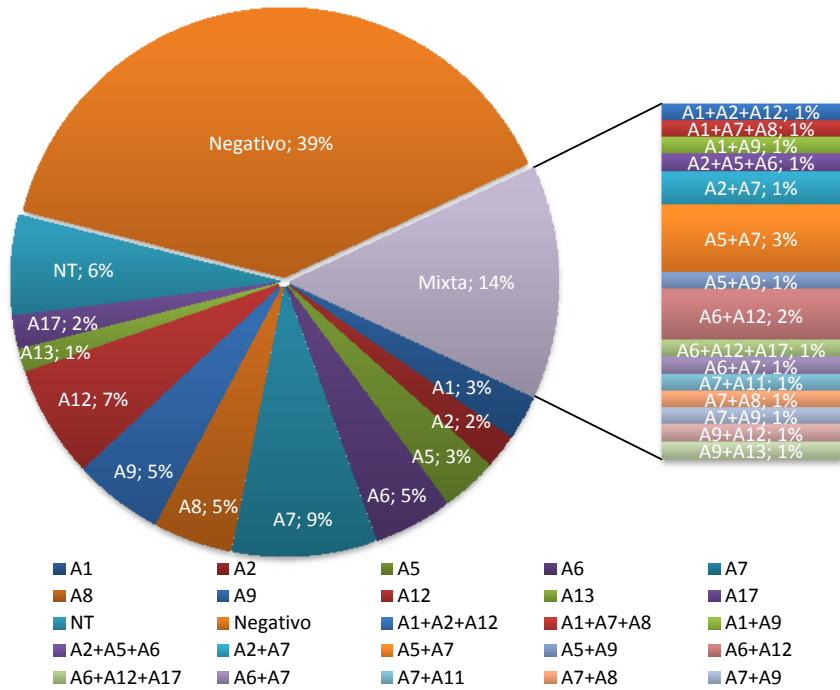


Figura 27: Frecuencia de la infección simple y mixta de serotipos de *M. haemolytica* detectados en pulmones con lesiones neumónicas (N=151).

No se detectó asociación entre el serotipo de *M. haemolytica* y la presencia de lesiones neumónicas ($p>0,05$). No obstante, la distribución de la muestra de pulmones en diferentes estratos por serotipo disminuye la potencia de la misma para detectar diferencias.

El serotipo aislado parece tener relación con la intensidad de la lesión neumónica según algunos estudios. Odugbo *et al.* 2004, encontraron que ovejas infectadas con el serotipo A2 tuvieron mayores puntuaciones en el grado de consolidación pulmonar comparado con las inoculadas con los serotipos A1 y A6 o A9, aunque esto no tuvo significancia estadística. El promedio de extensión de la lesión en las ovejas inoculadas con A2, A7 y A9 fueron significativamente más altos que los inoculados con otros serotipos, de lo que se deduce que estos serotipos poseen un tropismo al tejido pulmonar de corderos más alto que otros serotipos (Odugbo *et al.*, 2004).

Los serotipos A2, A6, A9, A11 y aislados NT pueden encontrarse en muestras de pulmones de bovinos con pasteurelosis neumónica (Al-Ghamdi *et al.*, 2000). El aislamiento de otros serotipos causando enfermedad puede ser sugerente de un cambio en la habilidad de estos serotipos para colonizar y proliferar en el tracto respiratorio inferior de los rumiantes y consecuentemente producir o no lesiones (Al-Ghamdi *et al.*, 2000).

Aunque existe clara evidencia de algún grado de protección cruzada entre serotipos de *M. haemolytica*, debido a la inclusión de toxoides que neutralizan la leucotoxina (Confer, 1993), la inmunidad es generalmente tipo específica (Chandrasekaran *et al.*, 1991; Donachie *et al.*, 1995). Estudios experimentales con diversas vacunas han evidenciado un buen nivel de inmunidad contra *M. haemolytica*, sin embargo, en los estudios de campo las mismas vacunas indujeron bajos niveles de anticuerpos protectores, lo que sugiere que la multiplicidad de serotipos en el campo de esta especie, puede ser la responsable de los fallos vacunales (Gilmour *et al.*, 1989; Gilmour y Gilmour, 1989b)

Se determinó la asociación entre la presencia de lesiones neumónicas y la detección de los factores de virulencia de *M. haemolytica* entre los que se observó mayor variación en su detección. Se detectó el gen *irp* en el 32,7% (86/263) de pulmones, de

los 86 aislados positivos al gen el 72,1% (62/86) fue detectado en pulmones con lesiones neumónicas. Existiendo asociación estadística significativa ($p < 0,0008$) entre la presencia del gen *irp* y la lesión (OR: 2,55; IC al 95% 1,47 – 4,45) (Figura 28).

En la mayoría de patógenos oportunistas, los genes asociados a la virulencia son expresados solo durante la infección del tejido blanco (Mekalanos, 1992). Pulmones puntuados con altos porcentajes de neumonía muestran la expresión de un mayor número de factores de virulencia (Lo *et al.*, 2006).

M. haemolytica y *P. multocida* utilizan sistemas de captación de hierro para sobrevivir en el tejido que infectan. Sin embargo, existe evidencia de que ambos microorganismos utilizan diferentes estrategias para adaptarse a ambientes limitados en hierro en su hospedador bovino (Roehrig *et al.*, 2007).

Las diferentes especies de *Mannheimia* requieren una alta concentración de hierro para la producción de la citotoxina, incluso más que para su propio crecimiento (Gentry *et al.*, 1987; Angen *et al.*, 1999a).

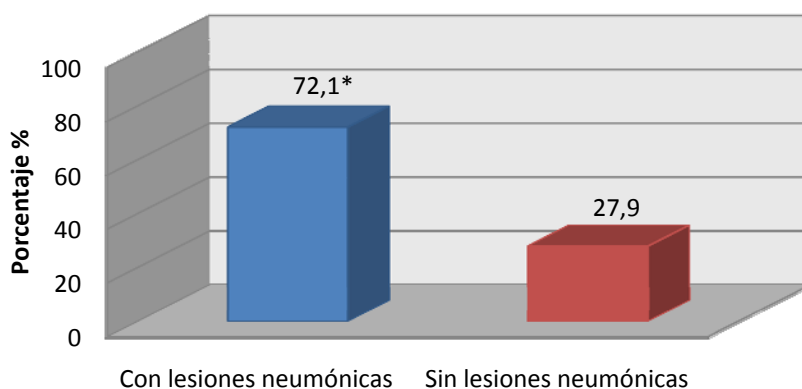


Figura 28: Frecuencia de detección del gen *irp* en relación en pulmones con y sin lesiones neumónicas.

V.12.3.2. Características de los aislados de *P. multocida*

En el estudio se aislaron solamente los serogrupos A y D de *P. multocida*. Los aislados procedentes del mismo pulmón pertenecieron todos ellos al mismo serogrupo,

excepto en un pulmón (muestra 69) en el que se aislaron conjuntamente cepas del serogrupo A y D. En el 17,5% (46/263) de los pulmones se aisló solo *P. multocida* del serogrupo A y en el 9,1% (24/263) de los pulmones se aisló solo *P. multocida* del serogrupo D (Figura 29). En tres pulmones se aislaron *P. multocida* no tipificables. En los muestreos 2 y 7 fue más frecuente el serogrupo A, mientras que en el muestreo 4 fue más frecuente el serogrupo D (Figura 29).

Tanto el serogrupo A como el D se asociaron a la presencia de lesiones neumónicas (Tabla 63). No se encontraron diferencias (OR 2,55; IC 95% 0,64- 10,10) entre el serogrupo de los aislados (A o D) y la presencia de lesiones neumónicas. Es decir, la presencia de lesiones neumónicas se asoció indistintamente a los serogrupos A y D.

Se considera que existe una asociación entre el tipo de serogrupo capsular y el hospedador y la enfermedad que origina (Choi *et al.*, 2001; Davies, 2004; Davies *et al.*, 2004; Ewers *et al.*, 2006; Bethe *et al.*, 2009). La neumonía bovina está causada principalmente por el serogrupo A de *P. multocida* (Christensen *et al.*, 2004; Frank, 1989; Madsen *et al.*, 1985).

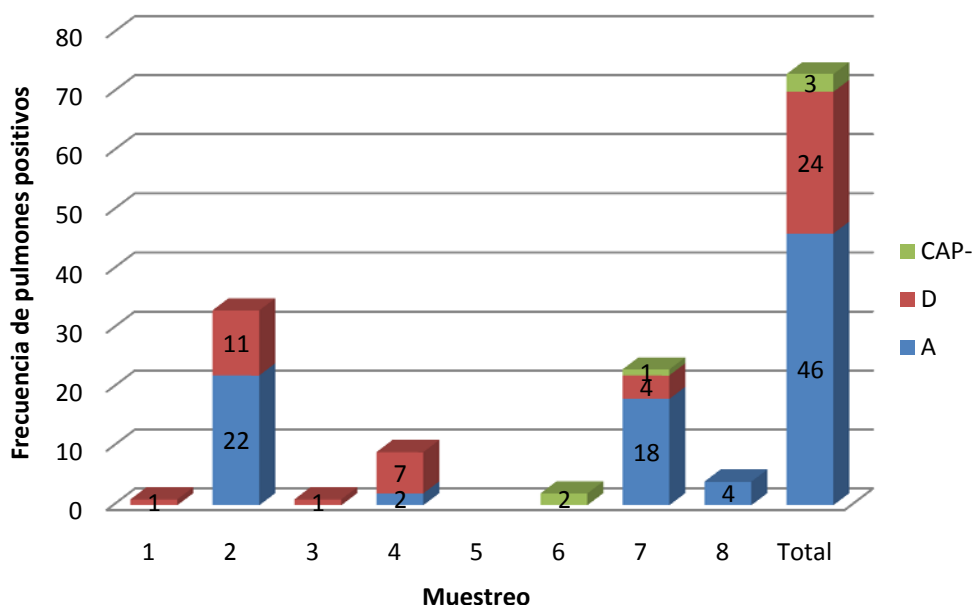


Figura 29: Frecuencia de aislamiento de serotipos de *P. multocida* en los pulmones analizados por lote de muestreo

Tabla 63: Asociación de los serotipos A y D con la presencia de lesiones neumónicas.

Serotipo	Pulmones con lesiones neumónicas	Pulmones sin lesiones neumónicas	OR	IC 95%
A	33	12	2,93	1,43-6,01
D	21	3	7,46	2,15-25-84
No aislamiento	92	98	1	

En el ganado porcino la pasteurelisis neumónica se asocia a cepas toxigénicas y no toxigénicas del serogrupo A aunque también se ha indicado el aislamiento del serogrupo D asociado a neumonía en cerdos (Fussing *et al.*, 1999). Sin embargo, la rinitis atrófica porcina se asocia a la presencia de cepas toxigénicas de *P. multocida* del serogrupo D y en menor medida del serogrupo A (Fussing *et al.*, 1999)(Pijoan *et al.*, 1983; Zhao *et al.*, 1992; Davies, Robert L. *et al.*, 2003; Bethe *et al.*, 2009). Aunque, un estudio realizado por Ewers *et al.* (2006) reveló que los serogrupos capsulares A y D estaban asociados en la misma medida a las lesiones neumónicas en cerdos (Ewers *et al.*, 2006), lo que difiere de lo reportado en el pasado donde las lesiones neumónicas se asocian con frecuencia al serogrupo A (Fussing *et al.*, 1999; Davies, Robert L. *et al.*, 2003).

La distribución de serogrupos de *P. multocida* en los aislados ovino parece ser diferente que en otras especies animales (Davies *et al.*, 2003). Los brotes de neumonía en ovinos y cabras ocasionados por *P. multocida*, han sido asociados a los serogrupos A y D (Chandrasekaran *et al.*, 1991; Zamri-Saad *et al.*, 1996). Similares resultados hemos encontrado en este estudio, donde los serogrupos A y D se asociaron indistintamente a las lesiones neumónicas.

V.13. ANÁLISIS FACTORIAL (“ANÁLISIS CLUSTER”) DE PULMONES

Se realizó un análisis factorial de los resultados de diferentes variables en las muestras de pulmones con y sin signos de neumonía. Las variables tomadas en cuenta para definir los *cluster* fueron: grado de pureza de crecimiento en placa, aislamiento de *P.*

multocida, aislamiento de *M. haemolytica*, categoría de complejo respiratorio, PCR del serotipo capsular de *P. multocida*, perfiles genéticos de *P. multocida*, serotipo capsular de *M. haemolytica* (serotipos más comunes A6, A7, A9 y A12), tipo de infección por serotipos de *M. haemolytica* (simple o mixta), Perfiles genéticos de *M. haemolytica* (solo se tomaron en cuenta los perfiles 1 y 2 y los demás se agruparon en “otros”), Sensibilidad a la tilosina, tetraciclina, y betalactámicos, y resultado final de resistencia a antibióticos (sensible, resistente o multirresistente).

En el análisis se introdujeron los 263 pulmones tomados como muestra. Los *clusters* obtenidos fueron posteriormente relacionados con las variables, lesión neumónica y grado de consolidación pulmonar y número de muestreo. Los pulmones estudiados se agruparon en cuatro *clusters* distintos (Tabla 64). El cluster 1 englobó a todos los pulmones (100%) en los que no se aislaron *M. haemolytica* ni *P. multocida* y todos los pulmones en los que se aislaron bacterias que no pertenecían a la familia *Pasteurellaceae* (Tabla 64).

El cluster 2 incluye a todos los pulmones en los que se aisló *P. multocida* en infección simple, es decir, en ausencia de *M. haemolytica* (Tabla 64). En el 83,33% de estos pulmones se aisló *P. multocida* en pureza. Las características que definen a los aislados de *P. multocida* que infectaban a los pulmones de este cluster son el serotipo capsular A (66,67%), la multirresistencia a antibióticos (79,17%) y el perfil genético 1100 (87,50%), es decir, son cepas toxigénicas que además tienen el gen *tbpB*.

El cluster 3 incluye a todos los pulmones en los que se detectó infección mixta de *P. multocida* y *M. haemolytica* (Tabla 64). Los aislados de *P. multocida* de los pulmones de este cluster pertenecían a los serogrupos A (61,22% de los pulmones) o D (36,73%). Los aislados de *M. haemolytica* de este grupo pertenecían a los serotipos A6 ó A12 y a los genotipos 1 y 2 (Tabla 64). El 75% de los pulmones en los que se detectó la infección simple del serotipo A12 y el 53,8% de los pulmones con el serotipo A6 se incluyeron en este cluster. En el 91,84 % de los pulmones de este cluster se aislaron cepas multirresistentes (Tabla 64).

Tabla 64: Resultados del análisis factorial de los 263 pulmones estudiados.

Grupo: CLUSTER 1 / 4 (Número: 105 - Porcentaje: 39.92)							
Variable	Característica de la categoría	% de la categoría en el grupo	% de la categoría en set	% del grupo en la categoría	Valor de la Prueba	Probabilidad	Peso ponderado
TETRACIC	Negativo	100,00	39,92	100,00	18,45	0,000	105
TILOSINA	Negativo	100,00	39,92	100,00	18,45	0,000	105
BETALACT	Negativo	100,00	39,92	100,00	18,45	0,000	105
Categoría Complejo Respiratorio	Negativa	100,00	39,92	100,00	18,45	0,000	105
Resistencia a antibióticos	Sensible	100,00	40,68	98,13	17,97	0,000	107
Perfil genético M.h. Resumen	Ninguno	100,00	49,05	81,40	14,89	0,000	129
A12	Negativo	100,00	49,05	81,40	14,89	0,000	129
A9	Negativo	100,00	49,05	81,40	14,89	0,000	129
A6	Negativo	100,00	49,05	81,40	14,89	0,000	129
<i>M. haemolytica</i>	Negativo	100,00	49,05	81,40	14,89	0,000	129
A7	Negativo	100,00	49,05	81,40	14,89	0,000	129
Infección serotipo M.h.	Negativo	100,00	54,37	73,43	13,44	0,000	143
Grado de pureza	Negativo	47,62	19,01	100,00	10,18	0,000	50
Perfiles genéticos <i>P. multocida</i>	Ninguno	100,00	72,24	55,26	9,28	0,000	190
<i>P. multocida</i>	Negativo	100,00	72,24	55,26	9,28	0,000	190
PCR serotipo capsular P. m	Ninguno	100,00	73,38	54,40	9,03	0,000	193
Grado de pureza	Otras bacterias	38,10	15,21	100,00	8,84	0,000	40

...continuación

Grupo: CLUSTER 2 / 4 (Número: 24 - Porcentaje: 9.13)

Variable	Característica de la categoría	% de la categoría en el grupo	% de la categoría en set	% del grupo en la categoría	Valor de la Prueba	Probabilidad	Peso ponderado
Categoría Complejo Respiratorio	<i>P. multocida</i>	100,00	9,13	100,00	12,20	0,000	24
Grado de pureza	Solo <i>P. multocida</i>	83,33	7,98	95,24	10,28	0,000	21
<i>P. multocida</i>	Positivo	100,00	27,76	32,88	7,87	0,000	73
Perfiles genéticos <i>P. multocida</i>	1100	87,50	20,91	38,18	7,26	0,000	55
A6	Negativo	100,00	49,05	18,60	5,59	0,000	129
A9	Negativo	100,00	49,05	18,60	5,59	0,000	129
Perfil genético M.h. Resumen	Ninguno	100,00	49,05	18,60	5,59	0,000	129
A7	Negativo	100,00	49,05	18,60	5,59	0,000	129
<i>M. haemolytica</i>	Negativo	100,00	49,05	18,60	5,59	0,000	129
A12	Negativo	100,00	49,05	18,60	5,59	0,000	129
PCR serotipo capsular P. m	A	66,67	17,49	34,78	5,52	0,000	46
Resistencia a antibióticos	Multirresistente	79,17	27,38	26,39	5,37	0,000	72
TETRACIC	Positivo	41,67	8,37	45,45	4,64	0,000	22
Infección serotipo M.h.	Negativa	95,83	54,37	16,08	4,45	0,000	143
BETALACT	Negativo	91,67	54,37	15,38	3,89	0,000	143
TILOSINA	Positivo	79,17	48,29	14,96	3,02	0,001	127

...continuación

Group: CLUSTER 3 / 4 (Número: 49 - Porcentaje: 18.63)							
Variable	Característica de la categoría	% de la categoría en el grupo	% de la categoría en set	% del grupo en la categoría	Valor de la Prueba	Probabilidad	Peso ponderado
Categoría Complejo Respiratorio	P.m+M.h	100,00	18,63	100,00	99,99	0,000	49
<i>P. multocida</i>	Positivo	100,00	27,76	67,12	12,36	0,000	73
Resistencia a antibióticos	Multirresistente	91,84	27,38	62,50	10,69	0,000	72
TILOSINA	Positivo	100,00	48,29	38,58	8,78	0,000	127
<i>M. haemolytica</i>	Positivo	100,00	50,95	36,57	8,40	0,000	134
Perfiles genéticos <i>P. multocida</i>	1100	69,39	20,91	61,82	8,30	0,000	55
PCR serotipo capsular P. m	A	61,22	17,49	65,22	7,85	0,000	46
Grado de pureza	P.m+M.h.	40,82	9,13	83,33	7,17	0,000	24
A7	Negativo	83,67	38,02	41,00	7,15	0,000	100
A9	Negativo	83,67	42,59	36,61	6,39	0,000	112
PCR serotipo capsular P. m	D	36,73	9,13	75,00	6,23	0,000	24
Perfiles genéticos <i>P. multocida</i>	Otros	30,61	6,84	83,33	6,03	0,000	18
A12	Positivo	30,61	7,98	71,43	5,38	0,000	21
Infección serotipo M.h.	Simple	67,35	33,08	37,93	5,33	0,000	87
BETALACT	Negativo	87,76	54,37	30,07	5,32	0,000	143
A6	Negativo	71,43	41,06	32,41	4,61	0,000	108
Perfil genético M.h. Resumen	2	32,65	11,41	53,33	4,43	0,000	30
TETRACIC	Negativo	79,59	51,71	28,68	4,28	0,000	136
A6	Positivo	28,57	9,89	53,85	4,11	0,000	26
A12	Negativo	69,39	42,97	30,09	3,98	0,000	113
Grado de pureza	M.h+P.m+otros	59,18	34,60	31,87	3,76	0,000	91
Perfil genético M.h. Resumen	1	42,86	22,43	35,59	3,44	0,000	59
Infección serotipo M.h.	Mixta	26,53	12,55	39,39	2,84	0,002	33
TETRACIC	Positivo	20,41	8,37	45,45	2,83	0,002	22

...continuación

Group: CLUSTER 4 / 4 (Número: 85 - Porcentaje: 32.32)							
Variable	Característica de la categoría	% de la categoría en el grupo	% de la categoría en set	% del grupo en la categoría	Valor de la Prueba	Probabilidad	Peso ponderado
Categoría Complejo Respiratorio	<i>M. haemolytica</i>	100,00	32,32	100,00	17,82	0,000	85
Resistencia a antibióticos	Resistente	88,24	31,94	89,29	13,84	0,000	84
<i>M. haemolytica</i>	Positivo	100,00	50,95	63,43	12,16	0,000	134
A12	Negativo	92,94	42,97	69,91	11,76	0,000	113
TETRACIC	Negativo	97,65	51,71	61,03	11,13	0,000	136
A6	Negativo	85,88	41,06	67,59	10,35	0,000	108
A9	Negativo	83,53	42,59	63,39	9,37	0,000	112
BETALACT	Negativo	91,76	54,37	54,55	8,81	0,000	143
Perfiles genéticos <i>P. multocida</i>	Ninguno	100,00	72,24	44,74	7,98	0,000	190
<i>P. multocida</i>	Negativo	100,00	72,24	44,74	7,98	0,000	190
PCR serotipo capsular P. m	Ninguno	100,00	73,38	44,04	7,76	0,000	193
Grado de pureza	Solo M.h.	38,82	14,07	89,19	7,66	0,000	37
A7	Negativo	69,41	38,02	59,00	7,11	0,000	100
Infección serotipo M.h.	Simple	62,35	33,08	60,92	6,76	0,000	87
TILOSINA	Negativo	30,59	11,79	83,87	6,16	0,000	31
Perfil genético M.h. Resumen	3,4,5,6,7 y 8	38,82	17,11	73,33	6,09	0,000	45
Perfil genético M.h. Resumen	1	44,71	22,43	64,41	5,67	0,000	59
A7	Positivo	30,59	12,93	76,47	5,51	0,000	34
Grado de pureza	M.h.+P.m.+otros	56,47	34,60	52,75	4,96	0,000	91
TILOSINA	Positivo	69,41	48,29	46,46	4,64	0,000	127
Infección serotipo M.h.	Mixta	23,53	12,55	60,61	3,40	0,000	33
A9	Positivo	16,47	8,37	63,64	2,94	0,002	22

El cluster 4 agrupó a todos los pulmones en los que se aisló *M. haemolytica* en infección simple (en ausencia de *P. multocida*). Este cluster englobó la mayoría de los pulmones con aislados del serotipo A7 (76,47%) y A9 (63,64%) (Tabla 64). Los aislados de este grupo pertenecieron a los genotipos 1 y 3. En el 88,24% se aislaron cepas resistentes a alguno de los antibióticos estudiados.

En la tabla 65 se muestra el análisis de la asociación de los 4 clusters con la presencia de lesiones neumónicas. El cluster 1 no se asoció a la presencia de lesiones neumónicas (OR 0,26; IC 95% 0,16-0,44) mientras que sí se asociaron a las lesiones los cluster 2, 3 y 4. Los resultados del análisis por clusters indica que la presencia de lesiones neumónicas en corderos en matadero se asocian a la infección por *M. haemolytica* y *P. multocida*, tanto en infección mixta como simple.

Tabla 65: Asociación las lesiones neumónicas y los clusters detectados en el análisis factorial.

Cluster	Nº Pulmones (%)			OR (IC 95%)
	Total (n=263)	Con lesiones neumónicas (n=151)	Sin lesiones neumónicas (n=112)	
1	105	40 (38,10)	65 (61,90)	0,26 (0,16-0,44)
2	24	21 (87,50)	3 (12,50)	11,38 (3,19-40,6)
3	49	35 (71,43)	14 (28,57)	4,06 (1,95-84,8)
4	85	55 (64,71)	30 (35,29)	2,98 (1,65-5,40)

La infección simple por *M. haemolytica* (cluster 4) se asocia a los serotipos A7 y A9 (Tabla 64) y parece estar ampliamente difundida puesto que se detectó en todos los muestreos (Tabla 66). Las infecciones simples por *P. multocida* (cluster 2) se asociaron al serotipo A (Tabla 64). Las infecciones mixtas en los pulmones (cluster 3) se asociaron a *M. haemolytica* de los serotipos A6 y A12 y *P. multocida* de los serotipos A y D (Tabla 64).

Tabla 66: Distribución de los clusters por muestreo.

Muestreo	Nº de pulmones en los clusters				Total
	1	2	3	4	
1	33	0	1	11	45
2	16	4	29	3	52
3	20	0	1	9	30
4	2	3	6	19	30
5	13	0	0	18	31
6	10	2	0	19	31
7	11	12	11	6	40
8	0	3	1	0	4
Total	105	24	49	85	263

La frecuencia de aislamiento de *M. haemolytica* en pulmones de cordero sacrificados en matadero es relativamente alta en las zonas geográficas de procedencia de los corderos de este estudio (Extremadura y Madrid) y se asocia a la presencia de lesiones propias de la bronconeumonía crónica. El papel de *P. multocida* en la etiología de la pasteurelosis neumónica ovina podría ser más importante del que se le atribuye, al menos en los procesos crónicos o subclínicos.

En nuestra opinión, el término pasteurelosis neumónica ovina no debería ser sustituido por mannheimiosis puesto que pasteurelosis englobaría a las dos especies de la Familia *Pasteurellaceae* implicadas en su etiología: *M. haemolytica* y *P. multocida*.

VI. CONCLUSIONES

1. Las lesiones neumónicas craneoventrales de consolidación (bronconeumonía crónica) en los corderos sacrificados en matadero se asocian con la presencia de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*, tanto en infección simple como mixta de ambas bacterias.
2. Las frecuencia de aislamiento de *Mannheimia haemolytica* en pulmones de cordero sacrificados en matadero es relativamente alta en las zonas geográficas de procedencia de los corderos de este estudio (Extremadura y Madrid).
3. *Bibersteinia trehalosi* no parece estar asociada con los procesos neumónicos que cursan desde el inicio o que progresan a la forma crónica y que dejan lesiones de consolidación en los corderos sacrificados en matadero.
4. El papel de *P. multocida* en la etiología de la pasteurelosis neumónica ovina podría ser más importante del que se le atribuye, al menos en los procesos crónicos o subclínicos.
5. Las cepas de *P. multocida* implicadas en la etiología de la pasteurelosis neumónica ovina pertenecen a los serotipos A y D y la mayoría son toxigénicas (*toxA*⁺).
6. Las cepas de *M. haemolytica* asociadas a las lesiones neumónicas en los corderos procedentes de las zonas geográficas de este estudio pertenecen mayoritariamente a los serotipos A7, A9, A6 y A12.
7. Los perfiles genéticos mayoritarios de *M. haemolytica*, genotipos 1 y 2, son negativos al gen *sodC* y se diferencian en la ausencia o presencia del gen *irp* respectivamente.
8. El gen *sodC* fue el menos frecuente entre los aislados de *Mannheimia*, sin embargo su presencia se asoció con los serotipos A2 y A7, considerados los más importantes en la etiología de la pasteurelosis neumónica ovina.
9. En gen *tbpB* presenta al menos tres subtipos y el subtipo 2 se asocia a los serotipos A2 y A7 de *M. haemolytica*.
10. Los aislados de *Mannheimia* del serotipo A7 son un grupo heterogéneo fenotípica y genotípicamente, fundamentalmente en cuanto al tipo de gen *tbpB*.
11. La resistencia a la tilosina es frecuente en aislados de *M. haemolytica* procedentes de lesiones neumónicas de corderos en matadero.

12. La resistencia a varios antibióticos es frecuente en aislados de *P. multocida* procedentes de lesiones neumónicas de corderos en matadero.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, K.M., Lo, R.Y., Mellors, A., 1990. Distribution of glycoprotease activity and the glycoprotease gene among serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Biochem Soc Trans* 18, 901-903.
- Abdullah, K.M., Lo, R.Y., Mellors, A., 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease gene. *Journal of bacteriology* 173, 5597-5603.
- Abdullah, K.M., Udoh, E.A., Shewen, P.E., Mellors, A., 1992. A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. *Infect Immun* 60, 56-62.
- Ackermann, M.R., Brogden, K.A., 2000. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Microbes Infect* 2, 1079-1088.
- Ackermann, M.R., Cheville, N.F., Gallagher, J.E., 1991. Colonization of the pharyngeal tonsil and respiratory tract of the gnotobiotic pig by a toxigenic strain of *Pasteurella multocida* type D. *Vet Pathol* 28, 267-274.
- Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C., Baker, P.R., Beesley, J.E., Spacey, B., Craig, G.R., Nagy, L.K., 1984. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* (serotype A1) organisms. *J Gen Microbiol* 130, 2415-2426.
- Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C., Williams, J.M., 1985a. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* (serotype T4) organisms. *J Gen Microbiol* 131, 387-394.
- Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C., Williams, J.M., Beesley, J.E., 1985b. Purification, characterization and immunological properties of the capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* serotype T15: its identity with the K62 (K2ab) capsular polysaccharide of *Escherichia coli* and the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup H. *J Gen Microbiol* 131, 1963-1972.
- Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C., Williams, J.M., Beesley, J.E., 1986. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* serotype A7 organisms. *J Gen Microbiol* 132, 1079-1087.
- Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Williams, J.M., Lindon, J.C., 1987. Production of colominic acid by *Pasteurella haemolytica* serotype A2 organisms. *FEMS microbiology letters* 42, 23-25.
- Adler, B., Bulach, D., Chung, J., Doughty, S., Hunt, M., Rajakumar, K., Serrano, M., van Zanden, A., Zhang, Y., Ruffolo, C., 1999. Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J Biotechnol* 73, 83-90.
- Al-Ghamdi, G.M., Ames, T.R., Baker, J.C., Walker, R., Chase, C.C., Frank, G.H., Maheswaran, S.K., 2000. Serotyping of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J Vet Diagn Invest* 12, 576-578.
- Al-Haddawi, M.H., Jasni, S., Son, R., Mutalib, A.R., Bahaman, A.R., Zamri-Saad, M., Sheikh-Omar, A.R., 1999. Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits. *J Gen Appl Microbiol* 45, 269-275.
- Al-Haddawi, M.H., Jasni, S., Zamri-Saad, M., Mutalib, A.R., Zulkifli, I., Son, R., Sheikh-Omar, A.R., 2000. *In vitro* study of *Pasteurella multocida* adhesion to trachea, lung and aorta of rabbits. *Vet J* 159, 274-281.
- Al-Tarazi, Y.H., Dagnall, G.J., 1997. Nasal carriage of *Pasteurella haemolytica* serotypes by sheep and goats in Jordan. *Trop Anim Health Prod* 29, 177-179.
- Alexander, T.W., Cook, S.R., Yanke, L.J., Booker, C.W., Morley, P.S., Read, R.R., Gow, S.P., McAllister, T.A., 2008. A multiplex polymerase chain reaction assay for the

- identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. *Vet Microbiol* 130, 165-175.
- Ali, H.A., Sawada, T., Hatakeyama, H., Ohtsuki, N., Itoh, O., 2004a. Characterization of a 39kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol* 100, 43-53.
- Ali, H.A., Sawada, T., Noda, K., 2004b. Protectivity of an immunoaffinity-purified 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* in mice. *J Vet Med Sci* 66, 1603-1604.
- Ali, Q., Davies, R.L., Parton, R., Coote, J.G., Gibbs, H.A., 1992. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Pasteurella haemolytica* isolates from cattle and sheep. *J Gen Microbiol* 138, 2185-2195.
- Alley, M.R., Ionas, G., Clarke, J.K., 1999. Chronic non-progressive pneumonia of sheep in New Zealand - a review of the role of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *N Z Vet J* 47, 155-160.
- Ambagala, T.C., Ambagala, A.P., Srikumaran, S., 1999. The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta(2) integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 179, 161-167.
- Ames, T.R., Markham, R.J., Opuda-Asibo, J., Leininger, J.R., Maheswaran, S.K., 1985. Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Can J Comp Med* 49, 395-400.
- Angen, O., Aalbaek, B., Falsen, E., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1997a. Relationships among strains classified with the ruminant *Pasteurella haemolytica*-complex using quantitative evaluation of phenotypic data. *Zentralbl Bakteriell* 285, 459-479.
- Angen, O., Ahrens, P., Bisgaard, M., 2002. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microbiol* 84, 103-114.
- Angen, O., Caugant, D.A., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1997b. Genotypic relationships among strains classified under the (*Pasteurella*) *haemolytica*-complex as indicated by ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis. *Zentralbl Bakteriell* 286, 333-354.
- Angen, O., Muttters, R., Caugant, D.A., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1999a. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 1, 67-86.
- Angen, O., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1997c. Further studies of the relationships among strains classified as taxon 15, taxon 18, taxon 20, (*Pasteurella*) *granulomatis* or the (*Pasteurella*) *haemolytica*-complex in ruminants using quantitative evaluation of phenotypic data. *Zentralbl Bakteriell* 286, 317-332.
- Angen, O., Quirie, M., Donachie, W., Bisgaard, M., 1999b. Investigations on the species specificity of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol* 65, 283-290.
- Angen, O., Thomsen, J., Larsen, L.E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P.M., Enemark, J.M., 2009. Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet Microbiol* 137, 165-171.
- Atashpaz, S., Shayegh, J., Hejazi, M.S., 2009. Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR. *Res Vet Sci* 87, 355-357.
- Barbour, E.K., Nabbut, N.H., Hamadeh, S.K., Al-Nakhli, H.M., 1997. Bacterial identity and characteristics in healthy and unhealthy respiratory tracts of sheep and calves. *Vet Res Commun* 21, 421-430.

- Bastianello, S.S., Jonker, M.R., 1981. A report on the occurrence of septicaemia caused by *Pasteurella multocida* type E in cattle from Southern Africa. *J S Afr Vet Assoc* 52, 99-104.
- Baxi, K.K., Blobel, H., Bruckler, J., 1970. [The antigens of *Pasteurella multocida* serotypes B and E]. *Zentralbl Bakteriol Orig* 214, 101-104.
- Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., von Eiff, C., 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 42, 4988-4995.
- Bethe, A., Wieler, L.H., Selbitz, H.J., Ewers, C., 2009. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. *Vet Microbiol* 139, 97-105.
- Beyt, B.E., Jr., Sondag, J., Roosevelt, T.S., Bruce, R., 1979. Human pulmonary pasteurellosis. *JAMA* 242, 1647-1648.
- Biberstein, E.L., 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*, En: Bergan, T., Norris, J.P. (Eds.) *Methods in Microbiology*. Academic Press, London, pp. 253-269.
- Biberstein, E.L., Gills, M., Knight, H., 1960. Serological types of *Pasteurella hemolytica*. *Cornell Vet* 50, 283-300.
- Biberstein, E.L., Gills, M.G., 1962. The relation of the antigenic types to the A and T types of *Pasteurella haemolytica*. *J Comp Pathol* 72, 316-320.
- Biberstein, E.L., Hirsh, D.C., 1999. *Pasteurella*, En: Hirsh, D.C., Zee, C. (Eds.) *Veterinary Microbiology*. Blackwell Science Inc., p. 135.
- Biberstein, E.L., Meyer, M.E., Kennedy, P.C., 1958. Colonial variation of *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep. *J Bacteriol* 76, 445-452.
- Biberstein, E.L., Shreeve, B.J., Thompson, D.A., 1970. Variation in carrier rates of *Pasteurella haemolytica* in sheep flocks. I. Normal flocks. *J Comp Pathol* 80, 499-507.
- Biberstein, E.L., Thompson, D.A., 1966. Epidemiological studies on *Pasteurella Haemolytica* in sheep. *J Comp Pathol* 76, 83-94.
- Bingham, D.P., Moore, R., Richards, A.B., 1990. Comparison of DNA:DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species. *Am J Vet Res* 51, 1161-1166.
- Bisgaard, M., 1993. Ecology and significance of Pasteurellaceae in animals. *Zentralbl Bakteriol* 279, 7-26.
- Bisgaard, M., Houghton, S.B., Muters, R., Stenzel, A., 1991. Reclassification of German, British and Dutch isolates of so-called *Pasteurella multocida* obtained from pneumonic calf lungs. *Vet Microbiol* 26, 115-124.
- Bisgaard, M., Muters, R., 1986. Re-investigations of selected bovine and ovine strains previously classified as *Pasteurella haemolytica* and description of some new taxa within the *Pasteurella haemolytica*-complex. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 94, 185-193.
- Black, H., 1997. *Pasteurella* isolates from sheep pneumonia cases in New Zealand. *Surveillance* 24, 5 - 8.
- Black, H., Donachie, W., Duganzich, D., 1997. An outbreak of *Pasteurella multocida* pneumonia in lambs during a field trial of a vaccine against *Pasteurella haemolytica*. *N Z Vet J* 45, 58-62.
- Blackall, P.J., Bisgaard, M., Stephens, C.P., 2002. Phenotypic characterisation of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. *Aust Vet J* 80, 87-91.
- Blackall, P.J., Bojesen, A.M., Christensen, H., Bisgaard, M., 2007. Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 666-674.

- Blackall, P.J., Christensen, H., Beckenham, T., Blackall, L.L., Bisgaard, M., 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 353-362.
- Blackall, P.J., Fegan, N., Chew, G.T., Hampson, D.J., 1998. Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. *Microbiology* 144 (Pt 2), 279-289.
- Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Bowles, R., 1997. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Vet Microbiol* 57, 355-360.
- Blackall, P.J., Pahoff, J.L., Marks, D., Fegan, N., Morrow, C.J., 1995. Characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from fowl cholera outbreaks on turkey farms. *Aust Vet J* 72, 135-138.
- Blanco-Viera, F.J., Trigo, F.J., Jaramillo-Meza, L., Aguilar-Romero, F., 1995. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. *Rev Latinoam Microbiol* 37, 121-126.
- Boot, R., Van den Brink, M., Handgraaf, P., Timmermans, R., 2004. The use of the API 20 NE bacteria classification procedure to identify Pasteurellaceae strains in rodents and rabbits. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 31.
- Borrathybay, E., Sawada, T., Kataoka, Y., Ohtsu, N., Takagi, M., Nakamura, S., Kawamoto, E., 2003. A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Vet Microbiol* 97, 229-243.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Llagostera, M., Perez De Rozas, A.M., Badiola, I., Barbe, J., 2002. Characterization of the *Pasteurella multocida* hgbA gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infect Immun* 70, 5955-5964.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbe, J., Llagostera, M., 2004. *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Vet Microbiol* 99, 103-112.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Pérez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbé, J., Llagostera, M., 2004. *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Veterinary Microbiology* 99, 103-112.
- Boyce, J.D., Lo, R.Y.C., Wilkie, I., Adler, B. 2004. *Pasteurella* and *Mannheimia*. En *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O., eds. (Iowa, Blackwell Publishing), p. 456.
- Boyce, J.R., Lo, R., Wilkie, I., Adler, B. 2004. *Pasteurella* and *Mannheimia*. En *Pathogenesis of bacterial infectious in Animals.*, Giles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O., eds. (Carlton, Australia, Blackwell Publishing), pp. 273 - 294.
- Breider, M.A., Kumar, S., Corstvet, R.E., 1990. Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. *Infect Immun* 58, 1671-1677.
- Breider, M.A., Walker, R.D., Hopkins, F.M., Schultz, T.W., Bowersock, T.L., 1988. Pulmonary lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in neutrophil sufficient and neutrophil deficient calves. *Can J Vet Res* 52, 205-209.
- Brogden, K.A., Adlam, C., Lehmkuhl, H.D., Cutlip, R.C., Knights, J.M., Engen, R.L., 1989. Effect of *Pasteurella haemolytica* (A1) capsular polysaccharide on sheep lung *in vivo* and on pulmonary surfactant *in vitro*. *Am J Vet Res* 50, 555-559.
- Brogden, K.A., Lehmkuhl, H.D., Cutlip, R.C., 1998. *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. *Vet Res* 29, 233-254.
- Brogden, K.A., Nordholm, G., Ackermann, M., 2007. Antimicrobial activity of cathelicidins BMAP28, SMAP28, SMAP29, and PMAP23 against *Pasteurella multocida* is more broad-spectrum than host species specific. *Vet Microbiol* 119, 76-81.
- Burrill, T.J., 1883. New species of *Micrococcus* (Bacteria). *Amer Naturalist* 17, 319 - 320.

- Burrows, G.E., Morton, R.J., Fales, W.H., 1993. Microdilution antimicrobial susceptibilities of selected gram-negative veterinary bacterial isolates. *J Vet Diagn Invest* 5, 541-547.
- Burrows, L.L., Olah-Winfield, E., Lo, R.Y., 1993. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect Immun* 61, 5001-5007.
- Cameron, C.M., Engelbrecht, M.M., Vermeulen, A.S., 1978. The serological and immunological relationship of type strains A and D of *Pasteurella multocida* to field isolates from sheep. *Onderstepoort J Vet Res* 45, 215-220.
- Carter, G.R., 1955. Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am J Vet Res* 16, 481-484.
- Carter, G.R., 1962. Further Observations on Typing *Pasteurella Multocida* by the Indirect Hemagglutination Test. *Can J Comp Med Vet Sci* 26, 238-240.
- Carter, G.R., 1963. Immunological Differentiation of Type B and E Strains of *Pasteurella Multocida*. *Can Vet J* 4, 61-63.
- Carter, G.R. 1989. *Fundamentos de Bacteriología y Micología Veterinaria* (España, Acribia).
- CAST, C.f.A.S.a.T.-. 2008. *Pasteurellosis Transmission Risks between Domestic and Wild Sheep*, CAST, ed. (Ames, Iowa).
- Catry, B., Baele, M., Opsomer, G., de Kruif, A., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2004. tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. *Vet Microbiol* 98, 251-260.
- Catry, B., Chiers, K., Schwarz, S., Kehrenberg, C., Decostere, A., de Kruif, A., 2005a. Fatal peritonitis caused by *Pasteurella multocida* capsular type F in calves. *J Clin Microbiol* 43, 1480-1483.
- Catry, B., Haesebrouck, F., Vlieghe, S.D., Feyen, B., Vanrobaeys, M., Opsomer, G., Schwarz, S., Kruif, A.D., 2005b. Variability in acquired resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from the nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types. *Microb Drug Resist* 11, 387-394.
- Clarke, C.R., Confer, A.W., Mosier, D.A., 1998. *In vivo* effect of *Pasteurella haemolytica* infection on bovine neutrophil morphology. *Am J Vet Res* 59, 588-592.
- Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A., Confer, A.W., 1989a. Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on isolated bovine neutrophils. *Toxicon* 27, 797-804.
- Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A., Confer, A.W., 1989b. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 57, 420-425.
- Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A., Timko, A.L., Confer, A.W., 1989c. Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on cultured bovine lymphoma cells. *Am J Vet Res* 50, 271-275.
- Clinkenbeard, K.D., Upton, M.L., 1991. Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am J Vet Res* 52, 453-457.
- CLSI, 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed. Approved standard M31-A3. 28(8). Wayne, PA., Clinical and Laboratory Standard Institute.
- Colin, R., Jaramillo, L., Aguilar, F., Trigo, F.J., Merino, M., 1987. [Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in lungs with pneumonia from sheep in Mexico]. *Rev Latinoam Microbiol* 29, 231-234.
- Confer, A.W., 1993. Immunogens of *Pasteurella*. *Vet Microbiol* 37, 353-368.
- Confer, A.W., Panciera, R.J., Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A., 1990. Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*. *Can J Vet Res* 54 Suppl, S48-52.
- Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J., Fulton, R.W., 1986. Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res* 47, 1853-1857.

- Confer, A.W., Simons, K.R., Panciera, R.J., Mort, A.J., Mosier, D.A., 1989. Serum antibody response to carbohydrate antigens of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: relation to experimentally induced bovine pneumonic pasteurellosis. *Am J Vet Res* 50, 98-105.
- Conlon, J.A., Shewen, P.E., 1993. Clinical and serological evaluation of a *Pasteurella haemolytica* A1 capsular polysaccharide vaccine. *Vaccine* 11, 767-772.
- Cox, A.J., Hunt, M.L., Boyce, J.D., Adler, B., 2003. Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. *Microb Pathog* 34, 287-296.
- Cruz, W.T., Young, R., Chang, Y.F., Struck, D.K., 1990. Deletion analysis resolves cell-binding and lytic domains of the *Pasteurella* leukotoxin. *Mol Microbiol* 4, 1933-1939.
- Cudd, L.A., Ownby, C.L., Clarke, C.R., Sun, Y., Clinkenbeard, K.D., 2001. Effects of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on apoptosis and oncosis of bovine neutrophils. *Am J Vet Res* 62, 136-141.
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Brogden, K.A., Hsu, N.J., 1996. Lesions in lambs experimentally infected with ovine adenovirus serotype 6 and *Pasteurella haemolytica*. *J Vet Diagn Invest* 8, 296-303.
- Czuprynski, C.J., Noel, E.J., Adlam, C., 1989. Modulation of bovine neutrophil antibacterial activities by *Pasteurella haemolytica* A1 purified capsular polysaccharide. *Microb Pathog* 6, 133-141.
- Czuprynski, C.J., Noel, E.J., Ortiz-Carranza, O., Srikumaran, S., 1991. Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 59, 3126-3133.
- Czuprynski, C.J., Welch, R.A., 1995. Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide. *Trends Microbiol* 3, 480-483.
- Chae, C.H., Gentry, M.J., Confer, A.W., Anderson, G.A., 1990. Resistance to host immune defense mechanisms afforded by capsular material of *Pasteurella haemolytica*, serotype 1. *Vet Microbiol* 25, 241-251.
- Chandrasekaran, S., Hizat, K., Saad, Z., Johara, M.Y., Yeap, P.C., 1991. Evaluation of combined *Pasteurella* vaccines in control of sheep pneumonia. *Br Vet J* 147, 437-443.
- Choi, C., Kim, B., Cho, W.S., Kim, J., Kwon, D., Cheon, D.S., Chae, C., 2001. Capsular serotype, *tox*A gene, and antimicrobial susceptibility profiles of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with pneumonia in Korea. *Vet Rec* 149, 210-212.
- Christensen, H., 2011. Population genetics of prokaryotes. En *Bioinformatics in Microbiology* (Copenhagen, Department of Veterinary Diseases Biology. Faculty of Life Sciences. Copenhagen University).
- Christensen, H., Angen, O., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 2004. Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. *Microbiology* 150, 1757-1767.
- Christensen, H., Bisgaard, M., Angen, O., Frederiksen, W., Olsen, J.E., 2005. Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. *J Clin Microbiol* 43, 259-270.
- Christensen, H., Bisgaard, M., Bojesen, A.M., Mutters, R., Olsen, J.E., 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 275-287.
- Chung, J.Y., Wilkie, I., Boyce, J.D., Townsend, K.M., Frost, A.J., Ghoddsu, M., Adler, B., 2001. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect Immun* 69, 2487-2492.
- Dabo, S.M., Confer, A.W., Hartson, S.D., 2005. Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Vet Microbiol* 110, 265-275.

- Dabo, S.M., Confer, A.W., Quijano-Blas, R.A., 2003. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microb Pathog* 35, 147-157.
- Dabo, S.M., Confer, A.W., Styre, D., Murphy, G.L., 1994. Expression, purification and immunologic analysis of three *Pasteurella haemolytica* A1 28-30 kDa lipoproteins. *Microb Pathog* 17, 149-158.
- Dabo, S.M., Taylor, J.D., Confer, A.W., 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 8, 129-150.
- Daniel, J.A., Held, J.E., Brake, D.G., Wulf, D.M., Epperson, W.B., 2006. Evaluation of the prevalence and onset of lung lesions and their impact on growth of lambs. *Am J Vet Res* 67, 890-894.
- Dassanayake, R.P., Call, D.R., Sawant, A.A., Casavant, N.C., Weiser, G.C., Knowles, D.P., Srikumaran, S., 2010. *Bibersteinia trehalosi* inhibits the growth of *Mannheimia haemolytica* by a proximity-dependent mechanism. *Appl Environ Microbiol* 76, 1008-1013.
- Dassanayake, R.P., Maheswaran, S.K., Srikumaran, S., 2007a. Monomeric expression of bovine beta2-integrin subunits reveals their role in *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced biological effects. *Infect Immun* 75, 5004-5010.
- Dassanayake, R.P., Shanthalingam, S., Davis, W.C., Srikumaran, S., 2007b. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of ovine (*Ovis aries*) leukocytes is mediated by CD18, the beta subunit of beta2-integrins. *Microb Pathog* 42, 167-173.
- Davies, R.L., 2004. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiology* 150, 4199-4210.
- Davies, R.L., Arkinsaw, S., Selander, R.K., 1997. Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep. *Infect Immun* 65, 3585-3593.
- Davies, R.L., Caffrey, B., Watson, P.J., 2003. Comparative analyses of *Pasteurella multocida* strains associated with the ovine respiratory and vaginal tracts. *Vet Rec.* 152, 7-10.
- Davies, R.L., Campbell, S., Whittam, T.S., 2002. Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (*lktCABD*) in *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *J Bacteriol* 184, 266-277.
- Davies, R.L., Donachie, W., 1996. Intra-specific diversity and host specificity within *Pasteurella haemolytica* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiology* 142 (Pt 7), 1895-1907.
- Davies, R.L., Lee, I., 2004. Sequence diversity and molecular evolution of the heat-modifiable outer membrane protein gene (*ompA*) of *Mannheimia*(*Pasteurella*) *haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *J Bacteriol* 186, 5741-5752.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R., Baillie, S., Caffrey, B., 2003. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *J Med Microbiol* 52, 59-67.
- Davies, R.L., MacCorquodale, R., Reilly, S., 2004. Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet Microbiol* 99, 145-158.
- Davies, R.L., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., 1996. Phylogenetic relationships and diversity within the *Pasteurella haemolytica* complex based on 16S rRNA sequence comparison and outer membrane protein and lipopolysaccharide analysis. *Int J Syst Bacteriol* 46, 736-744.
- Davies, R.L., Whittam, T.S., Selander, R.K., 2001. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (*lktA*) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *J Bacteriol* 183, 1394-1404.

- Deneer, H.G., Potter, A.A., 1989. Iron-repressible outer-membrane proteins of *Pasteurella haemolytica*. *J Gen Microbiol* 135, 435-443.
- Deressa, A., Asfaw, Y., Lubke, B., Kyule, M.W., Tefera, G., Zessin, K.H., 2010. Molecular Detection of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in sheep respiratory infections in Ethiopia. *Intern J Appl Res Vet Med* 8, 101-108.
- Deshpande, M.S., Ambagala, T.C., Ambagala, A.P., Kehrli, M.E., Jr., Srikumaran, S., 2002. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. *Infect Immun* 70, 5058-5064.
- Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Olsen, I., Fraser, G.J., 1993. Phylogeny of the Pasteurellaceae as determined by comparison of 16S ribosomal ribonucleic acid sequences. *Zentralbl. Bakteriol* 279, 35-44.
- Dey, S., Singh, V.P., Kumar, A.A., Sharma, B., Srivastava, S.K., Singh, N., 2007. Comparative sequence analysis of 16S rRNA gene of *Pasteurella multocida* serogroup B isolates from different animal species. *Research in Veterinary Science* 83, 1-4.
- Diker, K.S., Akan, M., Hazirolu, R., 1994. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic ovine lungs. *Vet Rec.* 134, 597-598.
- Diker, K.S., Akan, M., Kaya, O., 1999. Serotypes and electrophoretic protein profiles of *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic ovine lungs. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 106, 207-209.
- Dikova, T., 1975. [Serologic typing of strains of *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep]. *Vet Med Nauki* 12, 99-102.
- Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Ha, H., Walker, M.J., Chin, J.C., 1998. Demonstration that Australian *Pasteurella multocida* isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonia are non-toxigenic (*tox*A-) and display heterogeneous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxigenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis. *J Med Microbiol* 47, 679-688.
- Donachie, W., Fraser, J., Quirie, M., Gilmour, N.J., 1984. Studies on strains of *Pasteurella haemolytica* not typable by the indirect haemagglutination test. *Res Vet Sci* 37, 188-193.
- Donachie, W., Lainson, F.A., Hodgson, J.C., 1995. *Haemophilus, actinobacillus, and pasteurella*. Plenum Press, New York [etc.], VIII, 245 p. pp.
- Doughty, S.W., Ruffolo, C.G., Adler, B., 2000. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 72, 79-90.
- Doutre, M.P., Perreau, P., 1981. [*Pasteurella* sp. and *Mycoplasma arginini* carriers in healthy sheep in Senegal]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 34, 365-368.
- Duarte, E.R., Hamdan, J.S., 2004. Otitis in cattle, an aetiological review. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51, 1-7.
- Dugal, F., Belanger, M., Jacques, M., 1992. Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal rings preinfected with *Bordetella bronchiseptica*. *Can J Vet Res* 56, 260-264.
- Dungal, N., 1931. Contagious pneumonia in sheep. *J Comp Pathol Ther* 126-143.
- Dziva, F., Muhairwa, A.P., Bisgaard, M., Christensen, H., 2008. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 128, 1-22.
- Ekundayo, S., Odugbo, M., Olabode, A., Okewole, P., 2008. Phenotypic variability among strains of *Pasteurella multocida* isolated from avian, bovine, caprine, leporine and ovine origin. *African Journal of Biotechnology* 7, 1347-1350.
- Enderlein, G., 1917. Ein neues Bakteriensystem auf vergleichend morphologischer Grundlage (Bakteriologische Studien IV). *Berl. Ges. Naturfreund. Berlin*, 309-319.

- Ewers, C., 2006. Molecular epidemiologic analyses of bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia* to establish valid diagnostic tools based on Multiplex polymerase chain reactions. Doctoral. Zur Startseite der Freien Universität Berlin, Berlin, Alemania.
- Ewers, C., Lubke-Becker, A., Bethe, A., Kiebling, S., Filter, M., Wieler, L.H., 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet Microbiol* 114, 304-317.
- Ewers, C., Lubke-Becker, A., Wieler, L.H., 2004. [*Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of enzootic bronchopneumonia]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 117, 97-115.
- Fajfar-Whetstone, C., Coleman, L., Biggs, D., Fox, B., 1995. *Pasteurella multocida* septicemia and subsequent *Pasteurella dagmatis* septicemia in a diabetic patient. *J. Clin. Microbiol.* 33, 202-204.
- Fedorova, N.D., Highlander, S.K., 1997a. Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect Immun* 65, 2593-2598.
- Fedorova, N.D., Highlander, S.K., 1997b. Plasmids for heterologous expression in *Pasteurella haemolytica*. *Gene* 186, 207-211.
- Fegan, N., Blackall, P.J., Pahoff, J.L., 1995. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Vet Microbiol* 47, 281-286.
- Ferry, N.S., Hoskins, H.P., 1920. Bacteriology and control of contagious nasal catarrh (snuffles of rabbits). *J. Lab. Clin. Med.* , 311-318.
- Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B., Svanborg, C., 2006. Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur J Immunol* 36, 267-277.
- Fisher, M.A., Weiser, G.C., Hunter, D.L., Ward, A.C., 1999. Use of a polymerase chain reaction method to detect the leukotoxin gene *lktA* in biogroup and biovariant isolates of *Pasteurella haemolytica* and *P. trehalosi*. *Am J Vet Res* 60, 1402-1406.
- Fodor, L., Varga, J., Hajtos, I., Molnar, T., 1999. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* isolated from farm animals in Hungary. *Zentralbl Veterinarmed B* 46, 241-247.
- Fodor, L., Varga, J., Hajtos, I., Szemerédi, G., 1984. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep, goats and calves. *Zentralbl Veterinarmed B* 31, 466-469.
- Foged, N.T., Nielsen, J.P., Pedersen, K.B., 1988. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 26, 1419-1420.
- Forestier, C., Welch, R.A., 1991. Identification of RTX toxin target cell specificity domains by use of hybrid genes. *Infect Immun* 59, 4212-4220.
- Foreyt, W.J., Silflow, R.M., 1996. Attempted protection of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) from pneumonia using a nonlethal cytotoxic strain of *Pasteurella haemolytica*, biotype A, serotype. *J Wildl Dis* 32, 315-321.
- Francis, B.K., Schels, H.F., Carter, O.R., 1980. Type E *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia in Zambia. *Vet Rec* 107, 135.
- Frank, G.H., 1980. Serological groups among untypable bovine isolates of *Pasteurella haemolytica*. *J Clin Microbiol* 12, 579-582.
- Frank, G.H., 1982. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in sheep in the midwestern United States. *Am J Vet Res* 43, 2035-2037.
- Frank, G.H., 1985. Serotype-specific resistance to nasal colonization by *Pasteurella haemolytica* in cattle. *Am J Vet Res* 46, 2245-2248.
- Frank, G.H. 1989. *Pasteurellosis* of cattle. En *Pasteurella and Pasteurellosis*, Adlam, C., Rutter, J.M., eds. (London, Academic Press).
- Frank, G.H., Nelson, S.L., Briggs, R.E., 1989. Infection of the middle nasal meatus of calves with *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Am J Vet Res* 50, 1297-1301.

- Frank, G.H., Smith, P.C., 1983. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am J Vet Res* 44, 981-985.
- Frank, G.H., Tabatabai, L.B., 1981. Neuraminidase activity of *Pasteurella haemolytica* isolates. *Infect Immun* 32, 1119-1122.
- Fraser, J., Donachie, W., Quirie, M., Gilmour, N.J., 1983. Rapid indirect hemagglutination test for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J Clin Microbiol* 18, 206-207.
- Fraser, J., Gilmour, N.J., Laird, S., Donachie, W., 1982a. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* serotypes isolated from ovine pasteurellosis in Britain. *Vet Rec* 110, 560-561.
- Fraser, J., Laird, S., Gilmour, N.J., 1982b. A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. *Res Vet Sci* 32, 127-128.
- Friend, S.C., Wilkie, B.N., Thomson, R.G., Barnum, D.A., 1977. Bovine pneumonic pasteurellosis: experimental induction in vaccinated and nonvaccinated calves. *Can J Comp Med* 41, 77-83.
- Frymus, T., Muller, E., Petzoldt, K., 1989. Antigenic relationship between the dermonecrotic toxins produced by *Pasteurella multocida* type D and type A. *Zentralbl Veterinarmed B* 36, 199-202.
- Fuller, T.E., Kennedy, M.J., Lowery, D.E., 2000. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb Pathog* 29, 25-38.
- Fussing, V., Nielsen, J.P., Bisgaard, M., Meyling, A., 1999. Development of a typing system for epidemiological studies of porcine toxin-producing *Pasteurella multocida* ssp. *multocida* in Denmark. *Vet Microbiol* 65, 61-74.
- Gamaléia, N., 1888. Zur Aetiologie der Hühnercholera. *Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1* Orig., 161-168.
- García, B.N., 2009. Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Gentry, M.J., Confer, A.W., Craven, R.C., 1987. Effect of repeated *in vitro* transfer of *Pasteurella haemolytica* A1 on encapsulation, leukotoxin production, and virulence. *J Clin Microbiol* 25, 142-145.
- Gentry, M.J., Confer, A.W., Holland, S.G., 1988. Comparison of the toxic and antigenic properties of single bovine isolates of *Pasteurella haemolytica* representing five serotypes and an untypable strain. *Vet Microbiol* 16, 351-367.
- Gentry, M.J., Confer, A.W., Weinberg, E.D., Homer, J.T., 1986. Cytotoxin (leukotoxin) production by *Pasteurella haemolytica*: requirement for an iron-containing compound. *Am J Vet Res* 47, 1919-1923.
- Gibbs, H.A., Allan, E.M., Wiseman, A., Selman, I.E., 1984. Experimental production of bovine pneumonic pasteurellosis. *Res Vet Sci* 37, 154-166.
- Gilmour, M.I., Taylor, F.G., Wathes, C.M., 1989. Pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* and immune responses in mice following exposure to titanium dioxide. *Environ Res* 50, 184-194.
- Gilmour, N.J.L., Gilmour, J.S. 1989a. Pasteurellosis of sheep. En *Pasteurella and Pasteurellosis*, Adlam, C., Rutter, J.M., eds. (London, Academic Press), pp. 223 - 262.
- Gilmour, N.J.L., Gilmour, J.S. 1989b. Pasteurellosis of sheep. En *Pasteurella and Pasteurellosis*, Adlam, C., Rutter, J.M., eds. (London, Academic Press), pp. 223 - 254.
- Gioia, J., Qin, X., Jiang, H., Clindenbeard, K., Lo, R., Liu, Y., Fox, G.E., Yerrapragada, S., McLeod, M.P., McNeill, T.Z., Hemphill, L., Sodergren, E., Wang, Q., Muzny, D.M., Homsí, F.J., Weinstock, G.M., Highlander, S.K., 2006. The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: insights into virulence, natural competence, and Pasteurellaceae phylogeny. *J Bacteriol* 188, 7257-7266.

- Glorioso, J.C., Jones, G.W., Rush, H.G., Pentler, L.J., Darif, C.A., Coward, J.E., 1982. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infect Immun* 35, 1103-1109.
- Godinho, K.S., 2008. Susceptibility testing of tulathromycin: Interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates. *Veterinary Microbiology*, 426-432.
- Gonzalez-Rayos, C., Lo, R.Y., Shewen, P.E., Beveridge, T.J., 1986. Cloning of a serotype-specific antigen from *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun* 53, 505-510.
- Gonzalez, C., Murtaugh, M.P., Maheswaran, S.K., 1991. Genomic distribution of a serotype 1-specific antigen-coding DNA fragment of *Pasteurella haemolytica*. *Zentralbl Veterinarmed B* 38, 599-609.
- Gonzalez, C.T., Maheswaran, S.K., 1993. The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: review and hypotheses. *Br Vet J* 149, 183-193.
- Gonzalez, C.T., Maheswaran, S.K., Murtaugh, M.P., 1995. *Pasteurella haemolytica* serotype 2 contains the gene for a noncapsular serotype 1-specific antigen. *Infect Immun* 63, 1340-1348.
- Goodwin, K.A., Jackson, R., Brown, C., Davies, P.R., Morris, R.S., Perkins, N.R., 2004. Pneumonic lesions in lambs in New Zealand: patterns of prevalence and effects on production. *N Z Vet J* 52, 175-179.
- Groom, S.C., Hazlett, M.J., Little, P.B., 1986. An evaluation of the API ZYM system as a means of identifying *Haemophilus somnus* and related taxa. *Can J Vet Res* 50, 238-244.
- Guenther, S., Schierack, P., Grobbel, M., Lubke-Becker, A., Wieler, L.H., Ewers, C., 2008. Real-time PCR assay for the detection of species of the genus *Mannheimia*. *J Microbiol Methods* 75, 75-80.
- Gutierrez, C.B., De la Puente, V.A., Rodriguez, F.E., 2002. Géneros *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Mannheimia*, En: Vadillo, S., Piriz, S., Mateos, E. (Eds.) *Manual de Microbiología Veterinaria*. McGraw-Hill / Interamericana de España S.A.U., Madrid, pp. 357-377.
- Gutierrez Martin, C.B., Rodriguez Ferri, E.F., 1993. *In vitro* susceptibility of *Pasteurella multocida* subspecies *multocida* strains isolated from swine to 42 antimicrobial agents. *Zentralbl Bakteriell* 279, 387-393.
- Gwatkin, R., Dzenis, L., 1953. Rhinitis of Swine. VIII. Experiments with *Pasteurella Multocida*. *Can J Comp Med Vet Sci* 17, 454-464.
- Hajishengallis, G., Martin, M., Sojar, H.T., Sharma, A., Schifferle, R.E., DeNardin, E., Russell, M.W., Genco, R.J., 2002. Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 403-411.
- Hall, W.J., Heddleston, K.L., Legenhausen, D.H., Hughes, R.W., 1955. Studies on pasteurellosis. I. A new species of *Pasteurella* encountered in chronic fowl cholera. *Am. J. Vet. Res.* , 598-604.
- Hancock, R.D., Fallavena, L.C.B., Riberio, L.A.O., 1991. Pneumonic pasteurellosis due to *Pasteurella multocida* in a flock of lambs in Brazil. *Vet. Rec.* 128, 154-155.
- Harper, M., Boyce, J.D., Adler, B., 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* 265, 1-10.
- Harper, M., Boyce, J.D., Cox, A.D., St Michael, F., Wilkie, I.W., Blackall, P.J., Adler, B., 2007. *Pasteurella multocida* expresses two lipopolysaccharide glycoforms simultaneously, but only a single form is required for virulence: identification of two acceptor-specific heptosyl I transferases. *Infect Immun* 75, 3885-3893.
- Hassan, A.K., Mustafa, A.A., 1985. Isolation of *Pasteurella multocida* type B from an outbreak of haemorrhagic septicaemia in camels in the Sudan. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 38, 31-33.

- Hawari, A.D., Hassawi, D.S., Sweiss, M., 2008. Isolation and identification of Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in sheep and goats using biochemical tests and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Boil. Sci. 8, 1251-1254.
- Haziroglu, R., Diker, K.S., Gulbahar, M.Y., Akan, M., Guvenc, T., 1994. Studies of the pathology and microbiology of pneumonic lungs of lambs. Dtsch Tierarztl Wochenschr 101, 441-443.
- Haziroglu, R., Diker, K.S., Turkarslan, J., Gulbahar, M.Y., 1996. Detection of Mycoplasma ovipneumoniae and Pasteurella haemolytica antigens by an immunoperoxidase technique in pneumonic ovine lungs. Vet Pathol 33, 74-76.
- Heddlestone, K.L., 1976. Physiologic characteristics of 1,268 cultures of Pasteurella multocida. Am J Vet Res 37, 745-747.
- Heddlestone, K.L., Gallagher, J.E., Rebers, P.A., 1972a. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping Pasteurella multocida from avian species. Avian. Dis. 16, 925-936.
- Heddlestone, K.L., Goodson, T., Leibovitz, L., Angstrom, C.I., 1972b. Serological and biochemical characteristics of Pasteurella multocida from free-flying birds and poultry. Avian Dis 16, 729-734.
- Heddlestone, K.L., Rebers, P.A., 1972c. Fowl cholera: cross-immunity induced in turkeys with formalinkilled *in vivo*-propagated Pasteurella multocida. Avian Dis 16 578-586.
- Highlander, S.K., 2001. Molecular genetic analysis of virulence in Mannheimia (pasteurella) haemolytica. Front Biosci 6, D1128-1150.
- Highlander, S.K., Chidambaram, M., Engler, M.J., Weinstock, G.M., 1989. DNA sequence of the Pasteurella haemolytica leukotoxin gene cluster. DNA 8, 15-28.
- Highlander, S.K., Engler, M.J., Weinstock, G.M., 1990. Secretion and expression of the Pasteurella haemolytica Leukotoxin. J Bacteriol 172, 2343-2350.
- Highlander, S.K., Fedorova, N.D., Dusek, D.M., Panciera, R., Alvarez, L.E., Rinehart, C., 2000. Inactivation of Pasteurella (Mannheimia) haemolytica leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. Infect Immun 68, 3916-3922.
- Hilwig, R.W., Songer, J.G., Reggiardo, C., 1985. Experimentally induced pneumonic pasteurellosis: dose-response relationships and protection against natural reinfection in calves. Am J Vet Res 46, 2585-2587.
- Hinz, K.H., Kunjara, C., 1977. Haemophilus avium, a new species from chickens. Int. J. Syst. Bacteriol., 324-329.
- Hunt Gerardo, S., Citron, D.M., Claros, M.C., Fernandez, H.T., Goldstein, E.J., 2001. Pasteurella multocida subsp. multocida and P. multocida subsp. septica differentiation by PCR fingerprinting and alpha-glucosidase activity. J Clin Microbiol 39, 2558-2564.
- Hunt, M.L., Adler, B., Townsend, K.M., 2000. The molecular biology of pasteurella multocida. Vet Microbiol 72, 3-25.
- Hunt, M.L., Ruffolo, C.G., Rajakumar, K., Adler, B., 1998. Physical and genetic map of the Pasteurella multocida A:1 chromosome. J Bacteriol 180, 6054-6058.
- Hussein, A.M., Elsayi Mohamed, O., 1984. A serological survey of sheep sera for antibodies to Pasteurella haemolytica serotypes in the Sudan. Rev Elev Med Vet Pays Trop 37, 418-421.
- Ilhan, Z., Keles, I., 2007. Biotyping and Serotyping of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica Isolated from Lung Samples of Slaughtered Sheep in the Van Region. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31, 137-141.
- Iovane, G., Galdiero, M., Vitiello, M., De Martino, L., 1998. Effect of Pasteurella haemolytica outer membrane proteins on bovine neutrophils. FEMS Immunol Med Microbiol 20, 29-36.
- Isaacson, R.E., Trigo, E., 1995. Pili of Pasteurella multocida of porcine origin. FEMS Microbiol Lett 132, 247-251.

- Jacques, M., Belanger, M., Diarra, M.S., Dargis, M., Malouin, F., 1994. Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and *in vivo*. *Microbiology* 140 (Pt 2), 263-270.
- Jacques, M., Mikael, L.G. 2002. Virulence Factors of Pasteurellaceae, Formidable Animal Pathogens. En *ASM News* (USA, American Society for Microbiology).
- Jacques, M., Parent, N., Foiry, B., 1988. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to porcine nasal and tracheal epithelial cells. *Can J Vet Res* 52, 283-285.
- Jaramillo, A.C., Trigo, T.F., Suárez-Güernes, F., 2009. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Vet. Mex.* 40, 293-314.
- Jaramillo, L., Diaz, F., Hernandez, P., Debray, H., Trigo, F., Mendoza, G., Zenteno, E., 2000. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology* 10, 31-37.
- Jaramillo, M.L., Zenteno, E., Trigo, F.J., 1999. [Mechanisms of pathogenicity and adhesion in *Pasteurella haemolytica*]. *Rev Latinoam Microbiol* 41, 105-116.
- Jawetz, E., 1950. A pneumotropic pasteurella of laboratory animals. I. Bacteriological and serological characteristics of the organism. *J. Infect. Diseases.*, 172-183.
- Jaworski, M.D., Hunter, D.L., Ward, A.C., 1998. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. *J Vet Diagn Invest* 10, 49-55.
- Jeyaseelan, S., Hsuan, S.L., Kannan, M.S., Walcheck, B., Wang, J.F., Kehrli, M.E., Lally, E.T., Sieck, G.C., Maheswaran, S.K., 2000. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. *Infect Immun* 68, 72-79.
- Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S., Maheswaran, S.K., 2002. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim Health Res Rev* 3, 69-82.
- Jones, D.M., 1962. A pasteurella-like organism from the human respiratory tract. *J. Path. Bact.* , 143-151.
- Jones, G.E., Donachie, W., Gilmour, J.S., Rae, A.G., 1986. Attempt to prevent the effects of experimental chronic pneumonia in sheep by vaccination against *Pasteurella haemolytica*. *Br Vet J* 142, 189-194.
- Jones, G.E., Gilmour, J.S., Rae, A.G., 1982. The effect of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica* on specific pathogen-free lambs. *J Comp Pathol* 92, 261-266.
- Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W. 1997. Veterinary Pathology. En *The respiratory system*, Cann, C., ed. (Baltimore, Maryland - USA, Lippincott Williams & Wilkins), pp. 947 - 974.
- Kaehler, K.L., Markham, R.J., Muscoplat, C.C., Johnson, D.W., 1980. Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun* 30, 615-616.
- Kasten, R.W., Wakenell, P.S., Ahmad, S., Yilma, T.D., Hirsh, D.C., 1997. Lack of protection against avian cholera by vaccination with recombinant P6-like protein from *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 41, 972-976.
- Katsuda, K., Kamiyama, M., Kohmoto, M., Kawashima, K., Tsunemitsu, H., Eguchi, M., 2008. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. *Vet J* 178, 146-148.
- Kehrenberg, C., Catry, B., Haesebrouck, F., de Kruif, A., Schwarz, S., 2005. Novel spectinomycin/streptomycin resistance gene, *aadA14*, from *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3046-3049.
- Kehrenberg, C., Salmon, S.A., Watts, J.L., Schwarz, S., 2001a. Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the *tet(H)* plasmid pMHT1. *J Antimicrob Chemother* 48, 631-640.

- Kehrenberg, C., Schulze-Tanzil, G., Martel, J.L., Chaslus-Dancla, E., Schwarz, S., 2001b. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res* 32, 323-339.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., 2005. Plasmid-borne florfenicol resistance in *Pasteurella multocida*. *J Antimicrob Chemother* 55, 773-775.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., 2007. Mutations in 16S rRNA and ribosomal protein S5 associated with high-level spectinomycin resistance in *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2244-2246.
- Kehrenberg, C., Wallmann, J., Schwarz, S., 2008. Molecular analysis of florfenicol-resistant *Pasteurella multocida* isolates in Germany. *J Antimicrob Chemother* 62, 951-955.
- Kirby, S.D., Lainson, F.A., Donachie, W., Okabe, A., Tokuda, M., Hatase, O., Schryvers, A.B., 1998. The *Pasteurella haemolytica* 35 kDa iron-regulated protein is an FbpA homologue. *Microbiology* 144 (Pt 12), 3425-3436.
- Kirby, S.D., Ogunnariwo, J.A., Schryvers, A.B., 1995. Receptor-mediated iron acquisition from transferrin in the Pasteurellaceae, En: Donachie, F., Lainson, A., Hodgson, J.C. (Eds.) *Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella*. Plenum Press, New York, pp. 115-127.
- Kirkan, S., Kaya, O., 2005. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* strains isolated from pneumonic lungs of sheep in the Aydin Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 29, 491-494.
- Kirton, A.H., O'Hara, P.J., Shortridge, E.H., Cordes, D.O., 1976. Seasonal incidence of enzootic pneumonia and its effect on the growth of lambs. *N Z Vet J* 24, 59-64.
- Kitt, T. 1893. Septicaemia haemorrhagica. . En *Bakterienkunde und Pathologische Mikroskopie Für Thierärzte und Studierende der Thiermedizin* (Vienna, Moritz Perles), p. 304.
- Kodjo, A., Villard, L., Bizet, C., Martel, J.L., Sanchis, R., Borges, E., Gauthier, D., Maurin, F., Richard, Y., 1999. Pulsed-field gel electrophoresis is more efficient than ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis in discrimination of *Pasteurella haemolytica* strains. *J Clin Microbiol* 37, 380-385.
- Koneman, E. 1992. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (Philadelphia, EEUU., J.B. Lippincott Company:).
- Kuhnert, P., Boerlin, P., Emler, S., Krawinkler, M., Frey, J., 2000. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing. *Int J Med Microbiol* 290, 599-604.
- Kuhnert, P., Korczak, B.M., 2006. Prediction of whole-genome DNA-DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family Pasteurellaceae by multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology* 152, 2537-2548.
- Kumar, P., Singh, V.P., Agrawal, R.K., Singh, S., 2009. Identification of *Pasteurella multocida* isolates of ruminant origin using polymerase chain reaction and their antibiogram study. *Trop Anim Health Prod* 41, 573-578.
- Lacroix, R.P., Duncan, J.R., Jenkins, R.P., Leitch, R.A., Perry, J.A., Richards, J.C., 1993. Structural and serological specificities of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 61, 170-181.
- Lafleur, R.L., Abrahamsen, M.S., Maheswaran, S.K., 1998. The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 66, 4087-4092.
- Lafleur, R.L., Malazdrewich, C., Jeyaseelan, S., Bleifield, E., Abrahamsen, M.S., Maheswaran, S.K., 2001. Lipopolysaccharide enhances cytotoxicity and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella* (*Mannheimia*) *haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog* 30, 347-357.

- Lainson, F.A., Thomson, N., Rowe, H.A., Langford, P.R., Aitchison, K.D., Donachie, W., Kroll, J.S., 1996. Occurrence of [copper, zinc]-cofactored superoxide dismutase in *Pasteurella haemolytica* and its serotype distribution. *FEMS Microbiol Lett* 142, 11-17.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackebrandt, E., Goodfellow, M., eds. (Chichester, United Kingdom, John Wiley & Sons, Inc.), pp. 115-175.
- Larsen, J., Kuhnert, P., Frey, J., Christensen, H., Bisgaard, M., Olsen, J.E., 2007a. Analysis of gene order data supports vertical inheritance of the leukotoxin operon and genome rearrangements in the 5' flanking region in genus *Mannheimia*. *BMC Evol Biol* 7, 184.
- Larsen, J., Pedersen, A.G., Christensen, H., Bisgaard, M., Angen, O., Ahrens, P., Olsen, J.E., 2007b. Evidence for vertical inheritance and loss of the leukotoxin operon in genus *Mannheimia*. *J Mol Evol* 64, 423-437.
- Larsen, J., Pedersen, A.G., Davies, R.L., Kuhnert, P., Frey, J., Christensen, H., Bisgaard, M., Olsen, J.E., 2009. Evolution of the leukotoxin promoter in genus *Mannheimia*. *BMC Evol Biol* 9, 121.
- Lawrence, P.K., Kittichotirat, W., Bumgarner, R.E., McDermott, J.E., Herndon, D.R., Knowles, D.P., Srikumaran, S., 2010. Genome sequences of *Mannheimia haemolytica* serotype A2: ovine and bovine isolates. *J Bacteriol* 192, 1167-1168.
- Lee, C.W., Lo, R.Y., Shewen, P.E., Mellors, A., 1994a. The detection of the sialoglycoprotease gene and assay for sialoglycoprotease activity among isolates of *Pasteurella haemolytica* A1 strains, serotypes A13, A14, T15 and A16. *FEMS Microbiol Lett* 121, 199-205.
- Lee, C.W., Shewen, P.E., Cladman, W.M., Conlon, J.A., Mellors, A., Lo, R.Y., 1994b. Sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1: detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves. *Can J Vet Res* 58, 93-98.
- Lee, I., Davies, R.L., 2011. Evidence for a common gene pool and frequent recombinational exchange of the *tbpBA* operon in *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Bibersteinia trehalosi*. *Microbiology* 157, 123-135.
- Lehmann, K.B., Neumann, R. 1899. *Lehmann's Medizin. Handatlaten, X. Atlas mit Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik* (Germany, J.F. Lehmann München).
- Leite, F., O'Brien, S., Sylte, M.J., Page, T., Atapattu, D., Czuprynski, C.J., 2002. Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils *in vitro*. *Infect Immun* 70, 4336-4343.
- Letellier, A., Dubreuil, D., Roy, G., Fairbrother, J.M., Jacques, M., 1991. Determination of affinity of *Pasteurella multocida* isolates for porcine respiratory tract mucus, and partial characterization of the receptors. *Am J Vet Res* 52, 34-39.
- Li, J., Clinkenbeard, K.D., 1999. Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 67, 2920-2927.
- Lichtensteiger, C.A., Steenbergen, S.M., Lee, R.M., Polson, D.D., Vimr, E.R., 1996. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol* 34, 3035-3039.
- Lo, R.Y., 2001. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* A1. *Vet Microbiol* 83, 23-35.
- Lo, R.Y., McKerral, L.J., Hills, T.L., Kostrzynska, M., 2001. Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system. *Infect Immun* 69, 4458-4464.
- Lo, R.Y., Sathiamoorthy, S., Shewen, P.E., 2006. Analysis of *in vivo* expressed genes in *Mannheimia haemolytica* A1. *FEMS Microbiol Lett* 265, 18-25.
- Lo, R.Y., Shewen, P.E., Strathdee, C.A., Greer, C.N., 1985. Cloning and expression of the leukotoxin gene of *Pasteurella haemolytica* A1 in *Escherichia coli* K-12. *Infect Immun* 50, 667-671.

- Lo, R.Y., Strathdee, C.A., Shewen, P.E., 1987. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun* 55, 1987-1996.
- Lopez, A., 2001. Respiratory system, thoracic cavity and pleura, En: McGavin, M.D., Carlton, W.W., Zachary, J. (Eds.) *Thomson's Special Veterinary Pathology*. Mosby-Year Book Inc., pp. 125 - 195.
- Luo, Y., Zeng, Q., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Cheng, I.H., Wang, C., 1999. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine* 17, 821-831.
- Majury, A.L., Shewen, P.E., 1991. The effect of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxic culture supernate on the *in vitro* proliferative response of bovine lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 29, 41-56.
- Marcatili, A., D'Isanto, M., Galdiero, M., Pagnini, U., Palomba, E., Vitiello, M., Martone, F., 2000. Role of *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* and *Salmonella typhimurium* porins on inducible nitric oxide release by murine macrophages. *Res Microbiol* 151, 217-228.
- Marciel, A.M., Highlander, S.K., 2001. Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and cis-acting regulators of leukotoxin transcription. *Infect Immun* 69, 6231-6239.
- Marinella, M.A., 2004. Community-acquired pneumonia due to *Pasteurella multocida*. *Respir Care* 49, 1528-1529.
- Markham, R.J., Wilkie, B.N., 1980. Influence of bronchoalveolar washing supernatants and stimulated lymphocyte supernatants on uptake of *Pasteurella haemolytica* by cultured bovine alveolar macrophages. *Am J Vet Res* 41, 443-446.
- MARM 2009. Encuesta de ganado ovino, técnica, S.g.d.e.-S.g., ed. (España, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).
- Martin, W.B., 1996. Respiratory infections of sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 19, 171-179.
- May, B.J., Zhang, Q., Li, L.L., Paustian, M.L., Whittam, T.S., Kapur, V., 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3460-3465.
- Mbuthia, P.G., Christensen, H., Boye, M., Petersen, K.M., Bisgaard, M., Nyaga, P.N., Olsen, J.E., 2001. Specific detection of *Pasteurella multocida* in chickens with fowl cholera and in pig lung tissues using fluorescent rRNA in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 39, 2627-2633.
- McAllister, H.A., Carter, G.R., 1974. An aerogenic *Pasteurella*-like organism recovered from swine. *Am. J. Vet Res*, 917-922.
- McKerral, L.J., Lo, R.Y., 2002. Construction and characterization of an acapsular mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infect Immun* 70, 2622-2629.
- Mekalanos, J.J., 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 174, 1-7.
- Mifflin, J.K., Blackall, P.J., 2001. Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett Appl Microbiol* 33, 216-221.
- Mizan, S., Henk, A., Stallings, A., Maier, M., Lee, M.D., 2000. Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *J Bacteriol* 182, 6874-6883.
- Mohamed, R.A., Abdelsalam, E.B., 2008. A Review on Pneumonic Pasteurellosis (Respiratory Mannheimiosis) with Emphasis on Pathogenesis, Virulence Mechanisms and Predisposing Factors. *Bulgarian J. Vet. Med.* 11, 139 -160.
- Morck, D.W., Olson, M.E., Acres, S.D., Daoust, P.Y., Costerton, J.W., 1989. Presence of bacterial glycocalyx and fimbriae on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can J Vet Res* 53, 167-171.

- Morck, D.W., Raybould, T.J., Acres, S.D., Babiuk, L.A., Nelligan, J., Costerton, J.W., 1987. Electron microscopic description of glycocalyx and fimbriae on the surface of *Pasteurella haemolytica*-A1. *Can J Vet Res* 51, 83-88.
- Moxon, E.R., Kroll, J.S., 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 150, 65-85.
- Muller, H.E., Krasemann, C., 1974. [The virulence of *Pasteurella multocida* strains and their neuraminidase production (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 229, 391-400.
- Murphy, G.L., Whitworth, L.C., 1993. Analysis of tandem, multiple genes encoding 30-kDa membrane proteins in *Pasteurella haemolytica* A1. *Gene* 129, 107-111.
- Murphy, G.L., Whitworth, L.C., Clinkenbeard, K.D., Clinkenbeard, P.A., 1995. Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 63, 3209-3212.
- Murphy, G.L., Whitworth, L.C., Confer, A.W., Gaskins, J.D., Pandher, K., Dabo, S.M., 1998. Characterization of a *Pasteurella haemolytica* A1 mutant deficient in production of three membrane lipoproteins. *Am J Vet Res* 59, 1275-1280.
- Mutters, R., Bisgaard, M., Pohl, S., 1986. Taxonomic relationship of selected biogroups of *Pasteurella haemolytica* as revealed by DNA:DNA hybridizations. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 94, 195-202.
- Mutters, R., Christensen, H., Bisgaard, M., 2005. Genus *Pasteurella*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Proteobacteria, Garrity, G.M., Brenner, J.D., Krieg, N.R., Staley, J.T., eds. (Heidelberg, Springer), pp. 850-912.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W., Mannheim, W., 1985a. Reclassification of the Genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the Basis of Deoxyribonucleic Acid Homology, with Proposals for the New Species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int J Syst Bacteriol* 35, 309-322.
- Mutters, R., Piechulla, K., Hinz, K.-H., Mannheim, W., 1985b. *Pasteurella avium* (Hinz and Kunjara 1977) comb. nov. and *Pasteurella volantium* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 35, 5-9.
- Mutters, R., Pohl, S., Mannheim, W., 1986b. Transfer of *Pasteurella ureae* Jones 1962 to the Genus *Actinobacillus* Brumpt 1910: *Actinobacillus ureae* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 36, 343-344.
- Mwangota, A.U., Muhammed, S.I., Thomson, R.G., 1978. Serological types of *Pasteurella haemolytica* in Kenya. *Cornell Vet* 68, 84-93.
- Nagai, S., Someno, S., Yagihashi, T., 1994. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *J Clin Microbiol* 32, 1004-1010.
- Nagy, L.K., Penn, C.W., 1976. Protection of cattle against experimental haemorrhagic septicaemia by the capsular antigens of *Pasteurella multocida*, types B and E. *Res Vet Sci* 20, 249-253.
- Nakai, T., Sawata, A., Tsuji, M., Samejima, Y., Kume, K., 1984. Purification of dermonecrotic toxin from a sonic extract of *Pasteurella multocida* SP-72 serotype D. *Infect Immun* 46, 429-434.
- Namioka, S., Murata, M., 1961. Serological studies on *Pasteurella multocida*. I. A simplified method for capsule typing of the organism. *Cornell Vet* 51, 498-521.
- Narayanan, S.K., Nagaraja, T.G., Chengappa, M.M., Stewart, G.C., 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 84, 337-356.
- Newsom, I.E., Cross, F., 1932. Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 711 - 719.
- Ngatia, T.A., Kimberling, C.V., Johnson, L.W., Whiteman, C.E., Lauermann, L.H., Jr., 1986. Pneumonia in goats following administration of live and heat-killed *Pasteurella haemolytica*. *J Comp Pathol* 96, 557-564.

- Nyarko, K.A., Coomber, B.L., Mellors, A., Gentry, P.A., 1998. Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. *Vet Microbiol* 61, 81-91.
- Odendaal, M.W., Henton, M.M., 1995. The distribution of *Pasteurella haemolytica* serotypes among cattle, sheep, and goats in South Africa and their association with diseases. *Onderstepoort J Vet Res* 62, 223-226.
- Odugbo, M.O., Odama, L.E., Umoh, J.U., Lamorde, A.G., 2006. *Pasteurella multocida* pneumonic infection in sheep: Prevalence, clinical and pathological studies. *Small Ruminant Research* 66, 273-277.
- Odugbo, M.O., Odama, L.E., Umoh, J.U., Lombin, L.H., 2004. The comparative pathogenicity of strains of eight serovars and untypable strains of *Mannheimia haemolytica* in experimental pneumonia of sheep. *Vet Res* 35, 661-669.
- Odugbo, M.O., Odama, L.E., Umoh, J.U., Makinde, A.A., 2003. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from pneumonic lungs of sheep in northern Nigeria. *Small Ruminant Research* 48, 239-243.
- Ogunnariwo, J.A., Schryvers, A.B., 1990. Iron acquisition in *Pasteurella haemolytica*: expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. *Infect Immun* 58, 2091-2097.
- Ogunnariwo, J.A., Schryvers, A.B., 2001. Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *J Bacteriol* 183, 890-896.
- Ogunnariwo, J.A., Woo, T.K., Lo, R.Y., Gonzalez, G.C., Schryvers, A.B., 1997. Characterization of the *Pasteurella haemolytica* transferrin receptor genes and the recombinant receptor proteins. *Microb Pathog* 23, 273-284.
- OIE 2007. OIE List of Antimicrobials of Veterinary Medicine, Health, W.O.f.A., ed. (Oficina Internacional de Epizootias).
- Omaleki, L., Barber, S.R., Allen, J.L., Browning, G.F., 2010. *Mannheimia* species associated with ovine mastitis. *J Clin Microbiol* 48, 3419-3422.
- Oruc, E., 2006. The Pathologic and Bacteriologic Comparison of Pneumonia in Lambs. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30 593-599.
- Otulakowski, G.L., Shewen, P.E., Udoh, A.E., Mellors, A., Wilkie, B.N., 1983. Proteolysis of sialoglycoprotein by *Pasteurella haemolytica* cytotoxic culture supernatant. *Infect Immun* 42, 64-70.
- Pandher, K., Confer, A.W., Murphy, G.L., 1998. Genetic and immunologic analyses of PlpE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Infect Immun* 66, 5613-5619.
- Pandher, K., Murphy, G.L., 1996. Genetic and immunological analyses of a 38 kDa surface-exposed lipoprotein of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet Microbiol* 51, 331-341.
- Pandher, K., Murphy, G.L., Confer, A.W., 1999. Identification of immunogenic, surface-exposed outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Vet Microbiol* 65, 215-226.
- Paulsen, D.B., Confer, A.W., Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A., 1990. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release from and neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Vet Res* 51, 1635-1639.
- Paulsen, D.B., Mosier, D.A., Clinkenbeard, K.D., Confer, A.W., 1989. Direct effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide on bovine pulmonary endothelial cells *in vitro*. *American journal of veterinary research* 50, 1633-1637.
- Pedersen, K.B., Elling, F., 1984. The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Comp Pathol* 94, 203-214.
- Pegram, R.G., 1974. Serological types of *Pasteurella haemolytica* isolates from sheep and goats in the Somali Democratic Republic. *Trop Anim Health Prod* 6, 189-191.

- Penn, C.W., Nagy, L.K., 1974. Capsular and somatic antigens of *Pasteurella multocida*, types B and E. *Res Vet Sci* 16, 251-259.
- Petersen, K.D., Christensen, H., Bisgaard, M., Olsen, J.E., 2001a. Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial atpD sequence comparisons. *Microbiology* 147, 2739-2748.
- Petersen, K.D., Christensen, J.P., Bisgaard, M., 1998. Phenotypic and genotypic diversity of organisms previously classified as maltose positive *Pasteurella multocida*. *Zentralbl Bakteriol* 288, 1-12.
- Petersen, S.K., 1990. The complete nucleotide sequence of the *Pasteurella multocida* toxin gene and evidence for a transcriptional repressor, TxaR. *Mol Microbiol* 4, 821-830.
- Petras, S.F., Chidambaram, M., Illyes, E.F., Froshauer, S., Weinstock, G.M., Reese, C.P., 1995. Antigenic and virulence properties of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. *Infect Immun* 63, 1033-1039.
- Pijoan, C. 1999. Pneumonic Pasteurellosis. En *Diseases of Swine*, Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J., eds. (Ames, Iowa, Iowa State University Press), pp. 511-520.
- Pijoan, C., Morrison, R.B., Hilley, H.D., 1983. Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter. *J Clin Microbiol* 17, 1074-1076.
- Potter, A.A., Ready, K., Gilchrist, J., 1988. Purification of fimbriae from *Pasteurella haemolytica* A-1. *Microb Pathog* 4, 311-316.
- Potter, M.D., Lo, R.Y., 1995. Cloning and characterization of a gene from *Pasteurella haemolytica* A1 involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 129, 75-81.
- Poulsen, L.L., Reinert, T.M., Sand, R.L., Bisgaard, M., Christensen, H., Olsen, J.E., Stuen, S., Bojesen, A.M., 2006. Occurrence of haemolytic *Mannheimia* spp. in apparently healthy sheep in Norway. *Acta Vet Scand* 47, 70.
- Prince, D.V., Clarke, J.K., Alley, M.R., 1985. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from the respiratory tract of sheep in New Zealand. *N Z Vet J* 33, 76-77.
- Pullinger, G.D., Bevir, T., Lax, A.J., 2004. The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Mol Microbiol* 51, 255-269.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Iowa State University Press, A., ed. (Iowa, USA, Blackwell Publishing), p. 544.
- Quirie, M., Donachie, W., Gilmour, N.J., 1986. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet Rec* 119, 93-94.
- Rad, M., Movassaghi, A., Sharifi, K., Naseri, Z., Seifi, H., 2011. Two outbreaks of *Pasteurella multocida* septicemia in neonatal lambs. *Comparative Clinical Pathology* 20, 57-59.
- Radostitis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2000. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, 9na Edition. W.B. Saunders, 1877 p.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2000. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, 9na Edition. W.B. Saunders, 1877 p.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. 2000. *Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses* (London, GB: WB Saunders Co.), p. 1877.
- Rebers, P.A., Jensen, A.E., Laird, G.A., 1988. Expression of pili and capsule by the avian strain P-1059 of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 32, 313-318.
- Rhoades, K.R., Rimler, R.B., 1987. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Dis* 31, 895-898.

- Rhodes, M.B., New, C.W., Jr., Baker, P.K., Hogg, A., Underdahl, N.R., 1987. *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida* as agents of severe atrophic rhinitis of swine. *Vet Microbiol* 13, 179-187.
- Ribeiro, G.A., Carter, G.R., Frederiksen, W., Riet-Correa, F., 1989. *Pasteurella haemolytica*-like bacterium from a progressive granuloma of cattle in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1401-1402.
- Rice, J.A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D.C., Shewen, P.E., 2007. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 8, 117-128.
- Riley, L.W., 2004. *Molecular Epidemiology of infectious diseases: Principles and practices*. ASM Press, Washington, USA, 364 p.
- Rimler, R.B., Brogden, K.A., 1986. *Pasteurella multocida* isolated from rabbits and swine: serologic types and toxin production. *Am J Vet Res* 47, 730-737.
- Rimler, R.B., Rhoades, K.R., 1987. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol* 25, 615-618.
- Rimler, R.B., Rhoades, K.R., 1989. Solubilization of membrane-associated cross-protection factor(s) of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 33, 258-263.
- Roehrig, S.C., Tran, H.Q., Spehr, V., Gunkel, N., Selzer, P.M., Ullrich, H.J., 2007. The response of *Mannheimia haemolytica* to iron limitation: implications for the acquisition of iron in the bovine lung. *Vet Microbiol* 121, 316-329.
- Rosenbusch, C.T., Merchant, I.A., 1939. A study of the Hemorrhagic Septicemic *Pasteurellae*. *J. Bacteriol.* 69-89.
- Rowe, G.E., Pellett, S., Welch, R.A., 1994. Analysis of toxinogenic functions associated with the RTX repeat region and monoclonal antibody D12 epitope of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* 62, 579-588.
- Rowe, H.A., Poxton, I.R., Donachie, W., 2001. Survival of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* in tracheobronchial washings of sheep and cattle. *Vet Microbiol* 81, 305-314.
- Ruffolo, C.G., Adler, B., 1996. Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the *oma87* gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane antigen. *Infect Immun* 64, 3161-3167.
- Ruffolo, C.G., Tennent, J.M., Michalski, W.P., Adler, B., 1997. Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 65, 339-343.
- Saadati, M., Gibbs, H.A., Parton, R., Coote, J.G., 1997. Characterisation of the leukotoxin produced by different strains of *Pasteurella haemolytica*. *J Med Microbiol* 46, 276-284.
- Sabri, M.Y., Zamri-Saad, M., Mutalib, A.R., Israf, D.A., Muniandy, N., 2000. Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2, A7 or A9-enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. *Vet Microbiol* 73, 13-23.
- Sachse, K., Frey, J., 2003. PCR detection of microbial pathogens. Introduction. *Methods Mol Biol* 216, v-vi.
- Salmon, S.A., Watts, J.L., Case, C.A., Hoffman, L.J., Wegener, H.C., Yancey, R.J., Jr., 1995. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark. *J Clin Microbiol* 33, 2435-2444.
- Salmon, S.A., Watts, J.L., Yancey, R.J., Jr., 1993. Evaluation of the RapID NH system for identification of *Haemophilus somnus*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from cattle and pigs with respiratory disease. *J Clin Microbiol* 31, 1362-1363.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Salmon, S.A., Watts, J.L., 2004. *In vitro* activities of spectinomycin and comparator agents against *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* from respiratory tract infections of cattle. *J Antimicrob Chemother* 53, 379-382.

- Selander, R.K., Musser, J.M., Caugant, D.A., Gilmour, M.N., Whittam, T.S., 1987. Population genetics of pathogenic bacteria. *Microb Pathog* 3, 1-7.
- Shayegh, J., Atashpaz, S., Hejazi, M.S., 2008. Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 3, 206-213.
- Shayegh, J., Dolgari Sharaf, J., Mikaili, P., Namvar, H., 2009. Pheno- and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. *African Journal of Biotechnology* 8, 3708-3710.
- Sheehan, M., Cassidy, J.P., Brady, J., Ball, H., Doherty, M.L., Quinn, P.J., Nicholas, R.A., Markey, B.K., 2007. An aetiopathological study of chronic bronchopneumonia in lambs in Ireland. *Vet J* 173, 630-637.
- Shewen, P.E., Wilkie, B.N., 1982. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect Immun* 35, 91-94.
- Shewen, P.E., Wilkie, B.N., 1985. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *Am J Vet Res* 46, 1212-1214.
- Shivachandra, S.B., Kumar, A.A., Biswas, A., Ramakrishnan, M.A., Singh, V.P., Srivastava, S.K., 2004. Antibiotic sensitivity patterns among Indian strains of avian *Pasteurella multocida*. *Trop Anim Health Prod* 36, 743-750.
- Siju, J., Kumar, A.A., Shivachandra, S.B., Chaudhuri, P., Srivastava, S.K., Singh, V.P., 2007. Cloning and characterization of type 4 fimbrial gene (ptfA) of *Pasteurella multocida* serogroup B:2 (strain P52). *Vet Res Commun* 31, 397-404.
- Sisay, T., Zerihun, A., 2003. Diversity of *Mannheimia haemolytica* and *pasteurella trehalosi* serotypes from apparently healthy sheep and abattoir specimens in the highlands of Wollo, North East Ethiopia. *Vet Res Commun* 27, 3-14.
- Slocombe, R.F., Malark, J., Ingersoll, R., Derksen, F.J., Robinson, N.E., 1985. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am J Vet Res* 46, 2253-2258.
- Smith, G.R., 1960. The pathogenicity of *Pasteurella haemolytica* for young lambs. *J Comp Pathol* 70, 326-338.
- Smith, G.R., 1961. The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions in sheep. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 81, 431-440.
- Sneath, P.H., Stevens, M., 1990. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40, 148-153.
- Sneath, P.H.A., 1982. Status of nomenclatural types in the Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 459-460.
- Sneath, P.H.A., Stevens, M., 1990. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40, 148-153.
- Snipes, K.P., Biberstein, E.L., 1982. *Pasteurella testudinis* sp. nov.: a parasite of desert tortoises. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 201-210
- Snipes, K.P., Hirsh, D.C., Kasten, R.W., Carpenter, T.E., Hird, D.W., McCapes, R.H., 1990. Differentiation of field isolates of *Pasteurella multocida* serotype 3,4 from live vaccine strain by genotypic characterization. *Avian Dis* 34, 419-424.
- Stevens, P., Czuprynski, C., 1995. Dissociation of cytolysis and monokine release by bovine mononuclear phagocytes incubated with *Pasteurella haemolytica* partially purified leukotoxin and lipopolysaccharide. *Can J Vet Res* 59, 110-117.
- Stevens, P.K., Czuprynski, C.J., 1996. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis *in vitro*. *Infect Immun* 64, 2687-2694.

- Strathdee, C.A., Lo, R.Y., 1989a. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J Bacteriol* 171, 916-928.
- Strathdee, C.A., Lo, R.Y., 1989b. Regulation of expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J Bacteriol* 171, 5955-5962.
- Straus, D.C., Cooley, J.D., Purdy, C.W., 1996. *In vivo* production of neuraminidase by *Pasteurella multocida* A:3 in goats after transthoracic challenge. *Curr Microbiol* 33, 266-269.
- Straus, D.C., Jolley, W.L., Purdy, C.W., 1993a. Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun* 61, 4669-4674.
- Straus, D.C., Unbehagen, P.J., Purdy, C.W., 1993b. Neuraminidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain associated with bovine pneumonia. *Infect Immun* 61, 253-259.
- Sun, Y., Clinkenbeard, K.D., Clarke, C., Cudd, L., Highlander, S.K., Dabo, S.M., 1999a. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induced apoptosis of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation. *Vet Microbiol* 65, 153-166.
- Sun, Y., Clinkenbeard, K.D., Cudd, L.A., Clarke, C.R., Clinkenbeard, P.A., 1999b. Correlation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species. *Infect Immun* 67, 6264-6269.
- Tabatabai, L.B., Frank, G.H., 1997. Purification and characterization of a 31-kilodalton iron-regulated periplasmic protein from *Pasteurella haemolytica* A1. *Prep Biochem Biotechnol* 27, 253-269.
- Tabatabai, L.B., Zehr, E.S., 2004. Identification of five outer membrane-associated proteins among cross-protective factor proteins of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 72, 1195-1198.
- Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q., Chen, H., 2009. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J Clin Microbiol* 47, 951-958.
- Tatum, F.M., Briggs, R.E., Sreevatsan, S.S., Zehr, E.S., Ling Hsuan, S., Whiteley, L.O., Ames, T.R., Maheswaran, S.K., 1998. Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence. *Microb Pathog* 24, 37-46.
- Taylor, J.D., Fulton, R.W., Dabo, S.M., Lehenbauer, T.W., Confer, A.W., 2010. Comparison of genotypic and phenotypic characterization methods for *Pasteurella multocida* isolates from fatal cases of bovine respiratory disease. *J Vet Diagn Invest* 22, 366-375.
- Thompson, D.A., Fraser, J., Gilmour, N.J., 1977. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in ovine pasteurellosis. *Res Vet Sci* 22, 130-131.
- Thomson, R.G., 1974. Pathology and pathogenesis of the common diseases of the respiratory tract of cattle. *Can Vet J* 15, 249-251.
- Thumbikat, P., Dileepan, T., Kannan, M.S., Maheswaran, S.K., 2005. Mechanisms underlying *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced oncosis and apoptosis of bovine alveolar macrophages. *Microb Pathog* 38, 161-172.
- Topley, W.W.C., Wilson, G.S. 1929. The principles of bacteriology and immunity (London, Edward London & Co), p. 488.
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J., Adler, B., 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 39, 924-929.
- Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M., Dawkins, H.J., 1998. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 36, 1096-1100.
- Trevisan, V., 1885. Il fungo del cholera asiatico. Questioni risolte. *Atti Acad. Fisio. Med. Stat. Milano* 3, 78-91.

- Trevisan, V., 1887. Sul micrococco della rabbia e sulla possibilita di riconoscere durante il periodo d'incubazione dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha costratta l'infezione rabbica. Rend. R. 1st. Lomb. Sci. Let. Ser. II, 88-105.
- Trigo, F., 1987. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. Ciencia Veterinaria 4.
- Umesh, D., Lonkar, P.S., Srivastava, C.P., Bhagwan, P.S.K., 1994. An outbreak of pneumonia due to *Pasteurella multocida* in sheep. Indian Vet. J. 71, 1163-1167.
- Vera Lizarazo, Y.A., Rodriguez Ferri, E.F., Gutierrez Martin, C.B., 2008. Evaluation of different API systems for identification of porcine *Pasteurella multocida* isolates. Res Vet Sci 85, 453-456.
- Vestweber, J.G., Klemm, R.D., Leipold, H.W., Johnson, D.E., Bailie, W.E., 1990. Clinical and pathologic studies of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia in calves. Am J Vet Res 51, 1792-1798.
- Viera, F.J.B., Trigo, F.J.T., Mexa, L.J., 1993. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from ovine and caprine lungs. Vet. Mex. 24, 107-112.
- Villard, L., Gauthier, D., Lacheretz, A., Abadie, G., Game, Y., Maurin, F., Richard, Y., Borges, E., Kodjo, A., 2006. Serological and molecular comparison of Mannheimia haemolytica and Pasteurella trehalosi strains isolated from wild and domestic ruminants in the French Alps. Vet J 171, 545-550.
- Walmrath, D., Ghofrani, H.A., Rosseau, S., Schutte, H., Cramer, A., Kaddus, W., Grimminger, F., Bhakdi, S., Seeger, W., 1994. Endotoxin "priming" potentiates lung vascular abnormalities in response to Escherichia coli hemolysin: an example of synergism between endo- and exotoxin. J Exp Med 180, 1437-1443.
- Wang, J.F., Kieba, I.R., Korostoff, J., Guo, T.L., Yamaguchi, N., Rozmiarek, H., Billings, P.C., Shenker, B.J., Lally, E.T., 1998. Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced cell death. Microb Pathog 25, 317-331.
- Ward, A.C., Hunter, D.L., Jaworski, M.D., Benolkin, P.J., Dobel, M.P., Jeffress, J.B., Tanner, G.A., 1997. *Pasteurella* spp. in sympatric bighorn and domestic sheep. J Wildl Dis 33, 544-557.
- Watson, P.J., Davies, R.L., 2002. Outbreak of *Pasteurella multocida* septicaemia in neonatal lambs. Vet Rec. 151, 420-422.
- Watt, M.A., Mellors, A., Lo, R.Y., 1997. Comparison of the recombinant and authentic forms of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease. FEMS Microbiol Lett 147, 37-43.
- Watts, J.L., Yancey, R.J., Jr., Salmon, S.A., Case, C.A., 1994. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. J Clin Microbiol 32, 725-731.
- Weiser, G.C., DeLong, W.J., Paz, J.L., Shafii, B., Price, W.J., Ward, A.C., 2003. Characterization of *Pasteurella multocida* associated with pneumonia in bighorn sheep. J Wildl Dis 39, 536-544.
- Welch, R.A., Forestier, C., Lobo, A., Pellett, S., Thomas, W., Jr., Rowe, G., 1992. The synthesis and function of the Escherichia coli hemolysin and related RTX exotoxins. FEMS Microbiol Immunol 5, 29-36.
- White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D.D., McDermott, P.F., 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes Infect 4, 405-412.
- White, D.J., Jolley, W.L., Purdy, C.W., Straus, D.C., 1995. Extracellular neuraminidase production by a *Pasteurella multocida* A:3 strain associated with bovine pneumonia. Infect Immun 63, 1703-1709.
- Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J., Ames, T.R., 1990. Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1-derived endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine *Pasteurella* pneumonia. Vet Pathol 27, 150-161.

- Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J., Ames, T.R., Kannan, M.S., 1992. *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis. *J Vet Intern Med* 6, 11-22.
- Whittam, T.S., 1995. Genetic populations structure and pathogenicity in enteric bacteria, En: Baumberg, S., Young, J.P.W., Wellington, E.M.H., Saunders, J.R. (Eds.) *Population genetics of bacteria* Cambridge Univ. Press, United Kingdom, pp. 217-245.
- Wilson, M.A., Morgan, M.J., Barger, G.E., 1993. Comparison of DNA fingerprinting and serotyping for identification of avian *Pasteurella multocida* isolates. *J Clin Microbiol* 31, 255-259.
- Yates, W.D., 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med* 46, 225-263.
- Yoo, H.S., Maheswaran, S.K., Lin, G., Townsend, E.L., Ames, T.R., 1995a. Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 63, 381-388.
- Yoo, H.S., Rajagopal, B.S., Maheswaran, S.K., Ames, T.R., 1995b. Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. *Microb Pathog* 18, 237-252.
- Yoshimura, H., Ishimaru, M., Endoh, Y.S., Kojima, A., 2001. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48, 555-560.
- Younan, M., Fodor, L., 1995. Characterisation of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res Vet Sci* 58, 98.
- Zamri-Saad, M., Effendy, W.M., Maswati, M.A., Salim, N., Sheikh-Omar, A.R., 1996. The goat as a model for studies of pneumonic pasteurellosis caused by *Pasteurella multocida*. *Br Vet J* 152, 453-458.
- Zecchinon, L., Fett, T., Desmecht, D., 2005. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res* 36, 133-156.
- Zeng, H., Pandher, K., Murphy, G.L., 1999. Molecular cloning of the *Pasteurella haemolytica* *pomA* gene and identification of bovine antibodies against PomA surface domains. *Infect Immun* 67, 4968-4973.
- Zhao, G., Pijoan, C., Murtaugh, M.P., Molitor, T.W., 1992. Use of restriction endonuclease analysis and ribotyping to study epidemiology of *Pasteurella multocida* in closed swine herds. *Infect Immun* 60, 1401-1405.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Perfiles genéticos de aislados del Complejo *Mannheimia-Bibersteinia* presentes únicamente en 1 o 2 aislados.

Nº	Factores de virulencia estudiados en aislados del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> (n=488)																Perfil genético*	Frecuencia (Nº)	Porcentaje (%)
	<i>lktA</i>	<i>irp</i>	<i>gcp</i>	<i>sodA</i>	<i>pomA</i>	<i>sodC</i>	<i>hf</i>	<i>plpD</i>	<i>lpsA</i>	<i>pilA</i>	<i>adhes</i>	<i>tbpB</i>	<i>nanH</i>	<i>tonB</i>	<i>tbpA</i>	<i>fhaC</i>			
24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1111101011111111	2	0,4
25	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1111100011111111	2	0,4
26	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	1111000001001111	2	0,4
27	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1110111101111111	2	0,4
28	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1101111111111111	2	0,4
29	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1101101111111111	2	0,4
30	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	1100101111111011	2	0,4
31	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1100011101111111	2	0,4
32	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1011111011111111	2	0,4
33	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1011111001111111	2	0,4
34	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	1011000001001111	2	0,4
35	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	1001000001000011	2	0,4
36	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1000011101111111	2	0,4
37	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1000011100111111	2	0,4
38	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1111111100111111	1	0,2
39	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1111111011111111	1	0,2
40	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1111111001111111	1	0,2
41	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1111110111111111	1	0,2
42	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1111101111111110	1	0,2
43	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	1111101111110111	1	0,2

...continuación

Nº	Factores de virulencia estudiados en aislados del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> (n=488)																Perfil genético*	Frecuencia (Nº)	Porcentaje (%)
	<i>lktA</i>	<i>irp</i>	<i>gcp</i>	<i>sodA</i>	<i>pomA</i>	<i>sodC</i>	<i>hf</i>	<i>plpD</i>	<i>lpsA</i>	<i>pilA</i>	<i>adhes</i>	<i>tbpB</i>	<i>nanH</i>	<i>tonB</i>	<i>tbpA</i>	<i>fhaC</i>			
44	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1111101101111111	1	0,2
45	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1111101101011111	1	0,2
46	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1111011111111111	1	0,2
47	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1111001111111111	1	0,2
48	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1111001110111111	1	0,2
49	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1111000111111111	1	0,2
50	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1110111111111111	1	0,2
51	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1110101110111111	1	0,2
52	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	1110101101110111	1	0,2
53	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1110100111111111	1	0,2
54	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	1101101111111011	1	0,2
55	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1101101001111111	1	0,2
56	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	1100111101011111	1	0,2
57	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1100101101111111	1	0,2
58	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1011110111111110	1	0,2
59	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1011101111111110	1	0,2
60	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	1011101110111110	1	0,2
61	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1011101101111111	1	0,2
62	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1011101011111111	1	0,2
63	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1011101001111111	1	0,2
64	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1011100110111111	1	0,2
65	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	1011100001101111	1	0,2
66	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	1011100001011110	1	0,2

...continuación

Nº	Factores de virulencia estudiados en aislados del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> (n=488)																Perfil genético*	Frecuencia (Nº)	Porcentaje (%)
	<i>lktA</i>	<i>irp</i>	<i>gcp</i>	<i>sodA</i>	<i>pomA</i>	<i>sodC</i>	<i>hf</i>	<i>plpD</i>	<i>lpsA</i>	<i>pilA</i>	<i>adhes</i>	<i>tbpB</i>	<i>nanH</i>	<i>tonB</i>	<i>tbpA</i>	<i>fhaC</i>			
67	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1011001110111111	1	0,2
68	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	1011001110011111	1	0,2
69	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	1011000001000111	1	0,2
70	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	1001010001000001	1	0,2
71	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	1001001111110111	1	0,2
72	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	1001001110111110	1	0,2
73	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	1001000001011011	1	0,2
74	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	1001000001001111	1	0,2
75	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	1001000001000000	1	0,2
76	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1001000001000001	1	0,2
77	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	1000000100001110	1	0,2
78	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	1000000011001011	1	0,2
79	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1000000001111111	1	0,2
80	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	1000000001011111	1	0,2
81	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1000000000001111	1	0,2
82	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0110100001000000	1	0,2
83	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	0101100101111111	1	0,2
84	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	0101010001100000	1	0,2
85	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	0101000101000000	1	0,2
86	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	0101000001010111	1	0,2
87	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	0101000001000001	1	0,2

...continuación

Nº	Factores de virulencia estudiados en aislados del Complejo <i>Mannheimia-Bibersteinia</i> (n=488)																Perfil genético*	Frecuencia (Nº)	Porcentaje (%)
	<i>lktA</i>	<i>irp</i>	<i>gcp</i>	<i>sodA</i>	<i>pomA</i>	<i>sodC</i>	<i>hf</i>	<i>plpD</i>	<i>lpsA</i>	<i>pilA</i>	<i>adhes</i>	<i>tbpB</i>	<i>nanH</i>	<i>tonB</i>	<i>tbpA</i>	<i>fhaC</i>			
88	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0101000001000000	1	0,2
89	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0100000001111111	1	0,2
90	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	0001000101100000	1	0,2
91	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	0001000011001111	1	0,2
92	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	0001000001001001	1	0,2
93	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	0001000001000001	1	0,2
94	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0000010001000000	1	0,2
95	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0000000111111111	1	0,2
96	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	0000000010100000	1	0,2
97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	0000000001001111	1	0,2